

**PRODUKTION UND CHARAKTERISIERUNG
MONOKLONALER ANTIKÖRPER
GEGEN DIE
STAPHYLOKOKKEN-ENTEROTOXINE
B UND C₁**

Erika Kienle

Disbui. München

1988



**Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie, Infektions-
und Seuchenmedizin der Tierärztlichen Fakultät der
Universität München**

Vorstand: Prof. Dr. Dr. h.c. mult. A. Mayr

Arbeit angefertigt unter der Leitung von:

Prof. Dr. H. G. Buschmann

**PRODUKTION UND CHARAKTERISIERUNG
MONOKLONALER ANTIKÖRPER
GEGEN DIE STAPHYLOKOKKEN-ENTEROTOXINE B UND C₁**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität
München**

**von
Erika Kienle
aus Oberstaufen**

München 1988

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. M. Rüsse

Referent: Prof. Dr. H.G. Buschmann

Korreferent: Prof. Dr. M. Merckenschlager

Tag der Promotion: 29. Juli 1988

1. Einleitung

2. Zielsetzung

2.1. Zielsetzung der Untersuchung	1
2.2. Zielsetzung der Untersuchung	2
2.3. Zielsetzung der Untersuchung	3
2.4. Zielsetzung der Untersuchung	4
2.5. Zielsetzung der Untersuchung	5

3. Beschreibung der Methode

3.1. Beschreibung der Methode	6
3.2. Beschreibung der Methode	7

4. Ergebnisse

4.1. Ergebnisse	8
4.2. Ergebnisse	9
4.3. Ergebnisse	10
4.4. Ergebnisse	11
4.5. Ergebnisse	12
4.6. Ergebnisse	13
4.7. Ergebnisse	14
4.8. Ergebnisse	15
4.9. Ergebnisse	16
4.10. Ergebnisse	17
4.11. Ergebnisse	18
4.12. Ergebnisse	19
4.13. Ergebnisse	20
4.14. Ergebnisse	21
4.15. Ergebnisse	22
4.16. Ergebnisse	23
4.17. Ergebnisse	24
4.18. Ergebnisse	25
4.19. Ergebnisse	26
4.20. Ergebnisse	27
4.21. Ergebnisse	28
4.22. Ergebnisse	29
4.23. Ergebnisse	30
4.24. Ergebnisse	31
4.25. Ergebnisse	32
4.26. Ergebnisse	33
4.27. Ergebnisse	34
4.28. Ergebnisse	35
4.29. Ergebnisse	36
4.30. Ergebnisse	37
4.31. Ergebnisse	38
4.32. Ergebnisse	39
4.33. Ergebnisse	40
4.34. Ergebnisse	41
4.35. Ergebnisse	42
4.36. Ergebnisse	43
4.37. Ergebnisse	44
4.38. Ergebnisse	45
4.39. Ergebnisse	46
4.40. Ergebnisse	47
4.41. Ergebnisse	48
4.42. Ergebnisse	49
4.43. Ergebnisse	50
4.44. Ergebnisse	51
4.45. Ergebnisse	52
4.46. Ergebnisse	53
4.47. Ergebnisse	54
4.48. Ergebnisse	55
4.49. Ergebnisse	56
4.50. Ergebnisse	57
4.51. Ergebnisse	58
4.52. Ergebnisse	59
4.53. Ergebnisse	60
4.54. Ergebnisse	61
4.55. Ergebnisse	62
4.56. Ergebnisse	63
4.57. Ergebnisse	64
4.58. Ergebnisse	65
4.59. Ergebnisse	66
4.60. Ergebnisse	67
4.61. Ergebnisse	68
4.62. Ergebnisse	69
4.63. Ergebnisse	70
4.64. Ergebnisse	71
4.65. Ergebnisse	72
4.66. Ergebnisse	73
4.67. Ergebnisse	74
4.68. Ergebnisse	75
4.69. Ergebnisse	76
4.70. Ergebnisse	77
4.71. Ergebnisse	78
4.72. Ergebnisse	79
4.73. Ergebnisse	80
4.74. Ergebnisse	81
4.75. Ergebnisse	82
4.76. Ergebnisse	83
4.77. Ergebnisse	84
4.78. Ergebnisse	85
4.79. Ergebnisse	86
4.80. Ergebnisse	87
4.81. Ergebnisse	88
4.82. Ergebnisse	89
4.83. Ergebnisse	90
4.84. Ergebnisse	91
4.85. Ergebnisse	92
4.86. Ergebnisse	93
4.87. Ergebnisse	94
4.88. Ergebnisse	95
4.89. Ergebnisse	96
4.90. Ergebnisse	97
4.91. Ergebnisse	98
4.92. Ergebnisse	99
4.93. Ergebnisse	100

INHALT

Seite

1. Einleitung	1
2. Schrifttum	3
2.1. Immunreaktionen auf Staphylokokken-Enterotoxine	3
2.1.1. Reaktionen der myeloischen Zellen	4
2.1.2. Reaktionen der T-Lymphozyten	6
2.1.3. Reaktionen der B-Lymphozyten	8
2.1.4. Reaktionen der Null-Zellen	11
2.2. Produktion von monoklonalen Antikörpern gegen Staphylokokken-Enterotoxine B und C ₁	12
3. Eigene Untersuchungen	
3.1. Material und Methoden	15
3.1.1. Verzeichnis der regelmäßig verwendeten Materialien	15
3.1.2. Toxinmaterial	16
3.1.3. Herstellung monoklonaler Antikörper	17
3.1.3.1. Immunisierung der Mäuse	17
3.1.3.2. Kultivierung von Myelomzellen	19
3.1.3.3. Zellfusion	19
3.1.3.4. Kultivierung von Hybridomzellen	21
3.1.3.5. Klonierung	22
3.1.3.6. Produktion von Ascites	23
3.1.3.7. Gewinnen von serumfreien Hybridomkulturüber- ständen	24
3.1.3.8. Konservierung der Zellen	24

3.1.4. Reinigung monoklonaler Antikörper	25
3.1.4.1. Protein-Affinitätschromatographie	25
3.1.4.2. Ammoniumsulfatfällung und Dialyse	28
3.1.5. Herstellung von Biotinkonjugaten mit monoklonalen Antikörpern	28
3.1.5.1. Proteinbestimmung nach Lowry	29
3.1.5.2. Biotinylierung monoklonaler Antikörper	30
3.1.6. Charakterisierung monoklonaler Antikörper	32
3.1.6.1. Nachweis der Staphylokokken-Enterotoxin-B / C ₁ -Spezifität der monoklonalen Antikörper	32
3.1.6.1.1. Nachweis in Hybridomkulturen	33
3.1.6.1.2. Nachweis im Serum und in Ascites	34
3.1.6.1.3. Nachweis als Biotin-Konjugat	35
3.1.6.2. Bestimmung der Immunglobulinklassen und -subklassen	35
3.1.6.3. Nachweis von Kreuzreaktionen der monoklonalen Antikörper mit anderen Staphylokokken-Enterotoxintypen	36
3.1.6.4. Kompetitions-ELISA	37
3.2. Ergebnisse	39
3.2.1. Fusionen und produzierte monoklonale Antikörper	39
3.2.2. Spezifität der monoklonalen Antikörper gegenüber den Staphylokokken-Enterotoxinen B und C ₁	42
3.2.3. Reaktionen der monoklonalen Antikörper mit anderen Staphylokokken-Enterotoxinen	43
3.2.4. Bestimmung der Immunglobulinklassen und -subklassen der Staphylokokken-Enterotoxin-Antikörper	44
3.2.5. Produktion von Ascites und Proteinbestimmung	45

3.2.6. Biotinylierung der monoklonalen Antikörper	47
3.2.7. Vergleich der monoklonalen Antikörper im Kompetitions-ELISA	51
4. Besprechung der Ergebnisse	59
5. Zusammenfassung	63
6. Summary	64
7. Literaturverzeichnis	65
8. Abkürzungen	78

1. Einleitung

Die Staphylokokken-Enterotoxine sind eine Gruppe relativ kleiner Proteine (Molekulargewicht zwischen 27 000 und 30 000 Dalton), die durch verschiedene Stämme von *Staphylococcus aureus* gebildet werden. Es gibt sieben verschiedene Staphylokokkus-Enterotoxin-Typen (SE): SEA, SEB, SEC₁, SEC₂, SEC₃, SED und SEE), die alle nach einer Inkubationszeit von ein bis sechs Stunden Lebensmittelintoxikationen mit den Hauptsymptomen Erbrechen und Durchfall beim Menschen und anderen Primaten verursachen.

Sie unterscheiden sich durch ihre Antigenstruktur und können deshalb serologisch differenziert werden. Trotz dieser serologischen Unterschiede wurden kreuzreagierende Antikörper in polyvalentem Kaninchenserum, das gegen gereinigtes Toxin hergestellt wurde, beobachtet (Lee et al., 1978, 1980; Spero et al., 1978), mit besonderer Häufigkeit innerhalb der SEB-SEC-Gruppe. Unter den SE sind SEB und SEC₁ am besten charakterisiert. Die Aminosäuresequenz beider Toxine ist bekannt (Huang und Bergdoll, 1970; Schmidt und Spero, 1983) und bei der Trypsinverdauung entstehen typische Fragmente: Aus SEB zwei Polypeptide mit Molekulargewicht (MW) 17 000 und 11 500, und aus SEC₁ drei Polypeptide mit den MW 19 000, 6 500 und 4 000, wobei das Bruchstück MW 4 000 Teil des größten Fragmentes ist. Alle Fragmente, außer SEC₁-4 000, reagieren sowohl mit polyvalentem Anti-SEB als auch Anti-SEC₁-Serum (Spero und Morlock, 1979). Daraus kann auf zwei antigene Determinanten auf SEB und SEC₁ geschlossen werden, die auch mit heterologen Antikörpern reagieren.

Aufgabe dieser Arbeit war es, monoklonale Antikörper herzustellen, die hochspezifisch nur mit einem der jeweiligen Toxintypen reagieren. Solche Antikörper können zum Fortschritt in der Toxinreinigung und im Pool mit anderen monoklonalen Antikörpern gegen die anderen SE-Typen in der Diagnostik beitragen, da monoklonale Antikörper nach eindeutiger Charakterisierung eher "einer definierten Chemikalie" gleichzusetzen sind (Burger, 1985).

2. Schrifttum

Die Staphylokokken-Enterotoxine üben neben ihren allgemein bekannten toxischen Wirkungen auch starke Einflüsse auf das Immunsystem aus und veranlassen es zu vielfältigen und z.T. starken Reaktionen auf extrem kleine Mengen Toxin (Buxser et al., 1983). Die daher unter anderem von Peavy et al. (1970), Buxser et al. (1983) und Thompson et al. (1985) immer wieder aufgegriffene Theorie, daß die pharmakologischen Symptome der Intoxikationen eher auf immunologische Wirkungsweisen zurückzuführen sind, war Ausgangspunkt dieser Literaturzusammenstellung.

2.1. IMMUNREAKTIONEN AUF STAPHYLOKOKKEN-ENTEROTOXINE

Der Angriffsort der peroral aufgenommenen Staphylokokken-Enterotoxine (SE) ist zunächst der Gastrointestinaltrakt. Blutdruck- und Temperaturänderungen weisen darauf hin, daß SE in den Blutkreislauf gelangen, auch wenn sie bislang dort nach oraler Aufnahme nicht nachgewiesen wurden (Bergdoll, 1983). Passive Immunisierungsexperimente von Bergdoll (1966) bewiesen die Existenz enterotoxinneutralisierender Substanzen im Serum peroral "immunisierter" Affen. Sie müssen demnach wenigstens zum Teil durch das Darmepithel und die Lamina propria direkt in den Kreislauf diffundieren und auf diese Weise in den zentralen Immunitätsorganen zur Entwicklung einer systemischen Immunität führen (Rolle, und Mayr, 1984). Werden die SE intracutan (Silvermann et al., 1969) oder intramuskulär (Meyer et al., 1978) appliziert, ist es möglich, eine humorale Immunität gegenüber oral aufgenommenes Toxin zu erzeugen. Bei für die SE unempfindlichen Thailändern stellten Felsenfeld und Nasuniya (1964) natürlich erworbene Antikörper (Ak) fest.



Neben der oben an einigen Beispielen dargestellten Antigenität und Immunogenität besitzen die SE eine Reihe immunmodulatorischer Eigenschaften. Diese und die spezifischen antigenen Einflüsse werden nachfolgend überblicksweise beschrieben, die Gliederung hält sich dabei an die jeweils betroffenen Zelltypen. Ein Teil der Daten bis zum Jahre 1981 für diese Zusammenstellung wurden der zu diesem Thema verfaßten Literaturstudie von Steinhardt (1983) entnommen.

2.1.1. Reaktionen der myeloischen Zellen

Die myeloischen Zellen differenzieren sich aus einer gemeinsamen Knochenmarksstammzelle zu folgenden Zellsystemen:

- a) Mononukleäres phagozytäres System: Monozyten, Gewebemakrophagen (MP), antigenpräsentierende Zellen (APC)
- b) Polymorphkernige Granulozyten: Neutrophile, eosinophile und basophile Granulozyten, Mastzellen, Thrombozyten (Roitt et al., 1987; Vorländer, 1983). Über die Abwehrbeteiligung dieser zu den unspezifischen Abwehrmechanismen gezählten Zellpopulationen ist bezüglich der SE noch wenig veröffentlicht worden.

Buxser et al. (1983) untersuchten das in vitro Bindungsverhalten von radioaktiv markiertem Staphylokokken Enterotoxin A (^{125}J -SEA) an murinen Peritonealmakrophagen, B- und T-Lymphozyten. Eine Bindung von SEA über spezifische Rezeptoren an MP konnte nicht nachgewiesen werden, jedoch die Aufnahme von SEA durch die Makrophagen. Als Aufnahmemechanismus vermuteten die Autoren eine nicht rezeptorvermittelte Endozytose. Diese Zellen können anschließend die Mitogenese von T-Lymphozyten aus Milz und Thymus steigern, welche nicht direkt mit SEA Kontakt hatten. Mögliche Erklärungen dafür wären:

- a) Präsentation von intaktem oder verarbeitetem SEA auf der MP-Oberfläche im Sinne von APC

b) Freisetzung von Monokinen (z.B. Interleukin 1, ist IL-1), welche ihrerseits die Mitogenese stimulieren (Buxser et al., 1983).

Klinische Beobachtungen von Van Miert et al. (1984) an Ziegen, die SEB intravenös erhielten, erbrachten, daß Fieber und Veränderungen in Plasma-werten von Spurenelementen (Zink, Eisen) auf verschiedene Polypeptide zurückzuführen sind, die von den MP freigesetzt werden. Nach Ansicht der Autoren nimmt dabei IL-1 eine Schlüsselstellung ein. Endogenes Pyrogen (EP) aus aktivierten MP und Monozyten wirkt auf das zentrale Temperaturregulationszentrum. Leukozytenendogener Mediator (LEM) aus aktivierten neutrophilen Granulozyten verursacht den Abfall der Plasma-werte von Zink und Eisen. Diese und der lymphozytenaktivierende Faktor (LAF) werden jetzt unter dem Begriff IL-1 zusammengefaßt, obwohl die Sequenzanalysen dieser Stoffe noch nicht bekannt sind (Pepys, 1984). Die bei den Ziegen beobachtete Lymphopenie erklärte Van Miert (1984) mit einer besonderen Empfindlichkeit ihrer Lymphozyten auf Staphylokokken-enterotoxine.

Am Versuchstier Affe untersuchten Scheuber et al. (1985) und Bamberger et al. (1986) die Wirkungsmechanismen von intradermal appliziertem SEB und kamen zu dem Schluß, daß für SEB und auch evtl. für die anderen SE eigene Rezeptoren auf kutanen Mastzellen sitzen und so die beobachteten anaphylaktoiden Hautreaktionen vom Soforttyp direkt auslösen, unter Umgehung des regulären Weges über Mastzelle-(IgE)₂-Bindung. In weiteren Arbeiten konnten Scheuber et al. (1987) die cysteinylierten Leukotriene als die von Mastzellen sezernierten Mediatoren identifizieren, die in der Pathophysiologie von SEB induzierten Hautreaktionen und beim Erbrechen eine wichtige Rolle spielen.

Die unspezifische Schutzwirkung von SEA, SEB und SEC₂ gegenüber einer Mehrzahl ganz unterschiedlicher Infektionen und Antigenen untersuchten zusammenfassend Otani et al. (1985). Dabei zeigte SEA starke

Wirkung, SEB und SEC₂ waren dagegen vollkommen wirkungslos. Untersuchungskriterien waren die Schutzwirkung bei Mäusen gegenüber minimalen lethalen Dosen von *Escherichia coli* und anderen Bakterien, sowie *Candida albicans*; ferner die Vermehrung von peripheren polymorphkernigen Granulozyten im Blut und Steigerung der Chemilumineszenzaktivität derselben; Zunahme des Milzgewichts; die Proliferation von lymphoblast-ähnlichen Zellen in der Milz, die nur mit anti-Thy-1 (Pan-T-Zellmarker für Mäuse), nicht aber mit anti-Maus-Immunglobulin G reagierten. Ebenso trat die unspezifische Abwehrwirkung nicht bei den athymischen nu/nu Mäusen ein, was auf die wichtige Rolle der T-Lymphozyten hinweist, die neben den polymorphkernigen Granulozyten von den Autoren als die wichtigsten Träger der durch SEA induzierten immunmodulatorischen Wirkung genannt werden.

Eine gleichzeitig auftretende schwere Lymphopenie wurde auch von anderen Autoren an Affen (Crowley et al., 1966), Ziegen (Van Miert et al., 1984) und Ratten (Warren et al., 1975) beobachtet.

2.1.2. Reaktionen der T-Lymphozyten

Die durch die SE angeregten Reaktionen der T-Lymphozyten (thymusabhängige Lymphozyten) sind ein anschauliches Beispiel der vielfältigen Funktionen dieser Zellpopulation in der zellvermittelten Immunität. Unter zellvermittelter Immunität im allgemeinen Sinn versteht man jede Immunantwort, bei der Antikörper eine untergeordnete Rolle spielen, (Roitt, 1987)). Die untersuchten Antworten der T-Lymphozyten auf SE umfassen folgende Möglichkeiten:

- unspezifische mitogene Stimulation von T-Lymphozyten Subpopulationen
- Antigenbindung
- Freisetzung von Lymphokinen: γ -Interferon (INF γ), Migrations-Inhibitions-Faktor (MIF)

Dabei sind folgende Einzelheiten hervorzuheben:

- 1) Die Anwesenheit von B-Lymphozyten verstärkt erheblich die Mitogenese (Buxser et al., 1983), sie ist sogar von nicht-T-Lymphozyten absolut abhängig (Romagnani et al., 1984).
- 2) Die in vitro Versuche bezüglich der T-Lymphozyten Aktivierung wurden in der Regel mit Mäusemilzzellen durchgeführt und sind für SEA als T-Suppressorzellenaktivator bei Johnson und Bukovic (1975), Smith und Johnson (1975), Johnson et al. (1977a), Archer et al. (1979), Torres et al. (1982) und Platsoukas et al. (1986) belegt. SEA ist ein stärkeres Mitogen als Conavalin A (Con A) und aktiviert sowohl T-Helfer- als auch T-Suppressor-Zellen in Mäusemilzzellkulturen (Johnson et al., 1977a). Ebenso wirkt SEA mitogen stimulierend auf Mäusethymuszellen (Ulrich und Johnson, 1978; Buxser et al., 1983) und periphere Blutlymphozyten des Menschen (Langford et al., 1978; Romagnani et al., 1984).
- 3) SEB wirkt auf Mäusemilzzellkulturen und periphere Blutlymphozyten des Menschen fast identisch wie Phytohämagglutinin, ein T-Zell-Mitogen, verglichen nach den Kriterien Zellgröße, Zellmorphologie, Anfärbbarkeit und ^3H -Thymidin-Inkorporation (Peavy et al., 1970).
- 4) Für SEC_1 wurde nur die mitogene Stimulation von Mäusemilzzellen bestätigt (Warren et al., 1975). SED wirkt als T-Helferzell-Aktivator (Archer et al., 1979, 1981) und SEE allgemein als T-Lymphozyten Mitogen (Smith und Archer, 1978).
- 5) Das antivirale, antitumoröse und immunmodulatorische $\text{IFN}\gamma$ wird als Resultat der mitogenen Stimulation durch SEA im besonderen Maße, mehr als durch Con A freigesetzt (Johnson et al., 1977a). Im geringeren Umfang induzieren SEB (Langford et al., 1981), SED (Archer et al., 1978, 1981; Langford et al., 1981) und SEE (Langford et al., 1981) die γ -Interferon-Bildung.

- 6) Der Migrations-Inhibitions-Faktor (MIF), ein von Lymphocyten freigesetztes Protein, das die Beweglichkeit von Makrophagen eingeschränkt (Roitt et al., 1987), wird in Anwesenheit von SEB ausgeschüttet (Irvin et Sherry, 1970; Kaplan, 1972).
- 7) Das Enterotoxinbindungsvermögen der T-Zellen ist dreimal so stark wie das der B-Zellen und weist auf spezifische Rezeptoren für SE auf T-Zellen hin (Buxser et al., 1983).
- 8) In der mixed-lymphocyte-reaction hemmt SEA die T-zellvermittelte Zytotoxizität durch Induktion von Suppressor-Zellen (Platsoucas et al., 1986).

2.1.3. Reaktionen der B-Lymphocyten

Die B-Lymphocyten (bone marrow dependent oder Bursaäquivalent abhängige Lymphocyten) sind vorwiegend für die humoralen Immunreaktionen und somit für die Antikörperproduktion verantwortlich. Daneben haben sie auch Aufgaben in der Regulation der Immunantwort (Roitt, 1987). Die Antikörperproduktion auf Staphylokokken-Enterotoxin-Provokation ist sowohl in vitro als auch in vivo bekannt.

Den ersten Nachweis für in vivo gebildete Antikörper gegen SE führten Surgalla et al. (1954). Spezifische **Rezeptoren** für SEA auf B-Zellen wurden von Buxser et al. (1982) nachgewiesen.

Sofern die **Immunglobulinklassen** (Ig-Klassen) bestimmt wurden, gehörten die Toxin bindenden Ak zu den IgG (Józefczyk, 1974), nach Roitt (1987) gehören alle Toxinantikörper zum IgG Isotyp. Unter besonderen immunsuppressiven Bedingungen gelang es Scheuber et al. (1983), eine IgE anti-SEB Antwort zu erzielen.

Entsprechend einer Übereinkunft werden die SE **serologisch typisiert** (Casman et al., 1963). Dabei ist das Kaninchen das Tier der Wahl zur Herstellung spezifischer Ak für diagnostische Zwecke (Bergdoll, 1977). Des weiteren werden die SE jetzt in zwei Gruppen, mit **serologischen Kreuzreaktionen** innerhalb der Gruppen, eingeteilt: Gruppe 1: SEA und SEE, Gruppe 2: SEB, SEC₁, SEC₂ und SEC₃ (Spero et al., 1978; Lee et al., 1980; Bergdoll, 1983; Reiser et al., 1984). Kreuzreaktionen finden auch zwischen Trypsinspaltprodukten von SEB und SEC₁ und den dagegen entwickelten AK statt (Spero und Morlock, 1979).

Natürlich erworbene Antikörper sind sowohl bei erkrankten als auch bei in schlechten hygienischen Verhältnissen lebenden Personen (Felsenfeld und Nasuniya, 1964), bei Personen mit Wundinfektionen oder eitrigen Hautverletzungen (Jozefczyk, 1974) und auch bei in Enterotoxin-Laboratorien arbeitendem Personal nachweisbar (Jozefczyk, 1980). Obwohl das untersuchte Laborpersonal mit allen SE-Typen gearbeitet hatte, wurden kaum Antikörper gegen SEA gefunden. SEA scheint daher ein schwächeres Immunogen als die anderen SE zu sein (Jozefczyk, 1980).

Ein in vivo Schutz durch **Immunisierung** ist, wie an Mensch, Affe und Katze untersucht, prinzipiell möglich (Bergdoll, 1970). Ebenso können Affen durch Formaldehyd-inaktiviertes SEB und SEC₁ geschützt werden (Bergdoll, 1966; Silverman et al., 1969; Warren et al., 1975), nicht dagegen durch Formaldehyd-inaktiviertes SEA (Warren et al., 1975). Verwendung von Adjuvantien führten bei allen Staphylokokken-Enterotoxinen zur Steigerung der immunogenen Wirkung (Richter und Karsch, 1980).

Zu den Möglichkeiten der **Therapie und Prophylaxe** mittels spezifischer Antikörper macht Hahn (1983, 1986) folgende Beobachtungen: Bei Mäusen verliefen Therapieversuche durch orales Antiserum eine Stunde nach der oralen Toxingabe erfolgreich (Hahn, 1983). Bei Affen dagegen ist ein therapeutischer Einsatz von Ak eine Stunde nach der peroralen Toxingabe wirkungslos, nur eine perorale Kurzzeitprophylaxe mit Antiserum eine Stunde vor der Intoxikation führte zum gewünschten Schutz (Hahn, 1986).

Bezüglich der **immunregulativen Auswirkungen** der SE auf die B-Zellen wurden folgende Beobachtungen gemacht:

Die Ak-Produktion von B-Zellen im Hämolyse-Plaque-Test, einer Standardmethode zur Darstellung von antikörperbildenden Zellen, wird durch SEA und SEB (Smith und Johnson, 1975) und SEE (Archer et al., 1978) gehemmt, wenn die Toxinzugabe 24 Std. vorher oder gleichzeitig mit den Schaferythrozyten (SRBC) zu den Mäusemilzzellkulturen erfolgt. Eine Stimulation konnte bei der Toxinzugabe am 2. Tag beobachtet werden, ab dem dritten Tag blieb die Wirkung aus. SEA wirkte 30 mal stärker als SEB und 200 mal stärker als Concavalin A (Johnson und Bukovic, 1975). Die hemmende Wirkung von SEA wurde sowohl an T-Zell abhängigen Antigenen (Smith und Johnson, 1975) als auch an T-Zell unabhängigen Antigenen (Johnson und Bukovic, 1975) beobachtet.

SEE wirkt in gleicher Art und Stärke immunsuppressiv wie SEA (Smith und Archer, 1978). Dagegen bewirkt SED eine Vermehrung der Plaquebildenden Zellen im Hämolyse-Plaque-Test (Archer et al., 1978).

Eine ähnliche Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Toxinapplikation konnte in vivo für die B-Zellaktivität von Chen et al. (1980) nachgewiesen werden, der die Wirkung von SEA auf die Bildung von IgE (homozytotrope Antikörper) gegen Ovalbumin in Mäusen untersuchte.

Wie Untersuchungen von Johnson und Bukovic (1975) und Johnson et al. (1977b) zeigen, löst die Bildung von γ -Interferon aus aktivierten T-Suppressor-Zellen in der Mäusemilzzellkultur den eigentlichen immunsuppressiven Effekt aus: Die durch SE bedingte Immunsuppression in Mäusemilzkulturen läuft parallel und proportional zur Stärke der Interferonproduktion (Johnson et al., 1977b) und beide Aktivitäten lassen sich in vitro durch cAMP abschwächen (Johnson, 1977, Johnson et al., 1977a). Dazu steht in Übereinstimmung, daß insbesondere SEA ein starker T-Suppressor-Stimulator ist und SED T-Helfer-Zellen aktiviert (Archer et al., 1979, 1981); vergl. 2.1.2.. Dies entspricht auch neueren Kenntnissen

über die $\text{INF}\gamma$ -Wirkungen auf Mäusezellen. Von $\text{INF}\gamma$ wird angenommen, daß es einerseits die Aktivität der B-Zellen unterdrückt, die normalerweise in Antwort auf ein Antigen (Ag) proliferieren, andererseits aber die Immunantwort auf ein Ag zu einem späteren Zeitpunkt steigert, indem es dann die Proliferation der T-Suppressor-Zellen hemmt (Friedmann und Vogel, 1983).

Bezüglich der B-Zellen Suppression kann eine direkte Schädigung der Zellen durch das Toxin nicht in Betracht gezogen werden (Johnson et al., 1977a).

2.1.4. Reaktionen der Null-Zellen

Die Null-Zellen oder Zellen der dritten Population sind lymphatische Zellen, deren Entwicklungsgang noch unklar ist und die nicht die Merkmale von T-Zellen und B-Zellen aufweisen (Roitt, 1987). Zum größten Teil besteht diese Zellfraktion aus natürlichen Killerzellen (NK) und den antikörperabhängigen zellulär-zytotoxischen Zellen (antibody dependent cellular cytotoxic cells: ADCC), die beide unspezifisch Zellen töten können. Eine starke, von $\text{INF}\gamma$ unabhängige in vitro Steigerung der Zytotoxizität sowohl der NK als auch der ADCC durch SEA beobachteten Platsoucas et al. (1986) an peripheren humanen Blutlymphozyten, wobei die Monozyten vorher abgetrennt wurden. Dabei erwies sich SEA als stärkerer Stimulator als $\text{INF}\alpha$, das einen sehr wichtigen physiologischen Regulator der NK-Aktivität darstellt (Roitt et al., 1987).

2.2. PRODUKTION VON MONOKLONALEN ANTIKÖRPERN GEGEN STAPHYLOKOKKEN-ENTEROTOXINE B UND C₁

Monoklonale Antikörper (mAk) werden von Zellen (Hybridome) in Kultur gebildet, die von einer einzigen Ak-bildenden Zelle abstammen (monoklonal) und spezifisch für eine Determinante des Antigens (Epitop) sind.

An der Produktion von mAk, die an SEC₁ und SEB binden, arbeiten weltweit mehreren Forschungsgruppen, wobei aber Veröffentlichungen nur von vier Zentren vorliegen.

Die sogenannte "Wisconsin-Gruppe" beschäftigt sich schwerpunktmäßig mit der Entwicklung mAk, die mit einzelnen Toxinsubtypen reagieren (Thompson et al., 1984, 1985, 1986) und die mittels des Radioimmunassay (RIA) von Miller et al. (1978) selektiert wurden. Bei diesem Test werden 100 µl Ak-haltiger Zellkulturüberstand in 1 ml RIA-Puffer mit 12 000 cpm von ¹²⁵J-markiertem Toxin 1,5 Std. bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend werden 200 µl einer 10%-Lösung von Cowan I Zellen (enthalten Protein A und wirken so als Immunoabsorbans) zugefügt, das Gemisch 20 min lang inkubiert, die Zellen abzentrifugiert, der Überstand verworfen und die Radioaktivität im Zellpellet gemessen. Unspezifische Bindungen des radioaktiv markierten Toxins an die Cowan I Zellen wurden bis zu 400 cpm gemessen. Daher wurden nur Proben mit mindestens 1000 cpm als positiv angesehen (Thompson et al., 1985). Neben diesem "screening-test" wurde allen mAk noch im Western-Blot von gereinigtem Toxin auf SDS-PAGE (Polyacrylamid-Gelelektrophorese in Gegenwart von Natrium-Dodecyl-Sulfat) die homologe Toxinspezifität bestätigt. Die Kreuzreaktionen zu heterologen SE-Typen wurden im gleichen RIA untersucht und diese mAk dann in einem zweiten Hemm-RIA eingesetzt (Thompson et al., 1985). Dazu wurden dem mAk radioaktiv (¹²⁵J) markiertes und gleiches, nicht radioaktiv markiertes Toxin in Verdünnungsstufen angeboten, um die Stärke dieser Reaktion zu messen.

Als Ergebnis dieser Arbeiten wurden neben monoklonalen Antikörpern für die anderen Enterotoxine 13 mAk gegen SEB isoliert, von denen drei (die mAk 3B, 5B und 7B) auch mit SEC₁ und einer (12B) mit allen Subtypen von SEC reagiert. Gegen die SEC's wurden neun mAk entwickelt, die zum größten Teil mit allen SEC-Subtypen reagieren, nur zwei mAk davon (3C₂ und 6C₂) reagieren nicht mit SEC₁, und ein mAk (1C₁) markiert SEC₁ und SEB im RIA, jedoch nicht SEC₂ und SEC₃.

Außerdem konnten Reaktionen von vier mAk (4B, 1C₁, 2C₂ und 1C₃) aus diesen Gruppen mit dem durch Trypsinverdauung von Spero und Morlock (1979) gefundenem C₁-Fragment MW 19 000 (MW: Molekulargewicht) nachgewiesen werden. Ebenso reagierten vier mAk (1B, 2B, 4B und 1C₁) mit den Trypsinfragmenten MW 15 000 und WM 17 000 von SEB (Thompson et al., 1984).

Mit den oben erwähnten 13 mAk gegen SEB und neun mAk gegen die SEC-Gruppe wurde in einer weiteren Arbeit versucht, effektive Paare für Sandwich-ELISA's zum Nachweis von SEB bzw. der SEC-Gruppe auszuwählen (Thompson et al., 1986). Für SEB können als Fänger-Antikörper die mAk 2B oder 6B und als Test-Antikörper die mAk 6B oder 3B eingesetzt werden. Zur Erfassung aller SEC-Subtypen dient der mAk 1C₃ als Fänger-Antikörper und die mAk 4C₂ oder 2C₂ als Test-Antikörper. Diese Kombinationen sind mit einer Nachweisgrenze von 1ng Enterotoxin pro ml genauso gut wie enterotoxinspezifische polyklonale Antiseren (Thompson et al., 1986).

Von der "Rudger-FDA-Gruppe" wurden vier mAk beschrieben, die mit SEA, SEB, SEC₁, SED und SEE reagierten, obwohl die Mäuse nur mit SEA und SED wechselweise immunisiert wurden (Meyer et al., 1984; Thompson et al., 1985). Diese mAk tragen die "Namen" 24B9C, 6F310, 5FA9 und 2C59. Der "screening-ELISA", durchgeführt nach Voller et al. (1978), stellt einen indirekten ELISA auf Toxin-beschichteten Platten dar und zeigte höchste Extinktionswerte für Kreuzreaktionen mit SEB und SEC₁.

Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu den Arbeiten von Lee et al. (1978, 1980), denen zufolge SEB, SEC₁ und SEC₂ sowie SEA und SEE jeweils eine antigenetisch gemeinsame Gruppe bilden. Diese Kreuzreaktionen konnten auch von anderen Autoren nicht bestätigt werden (Thompson et al., 1985). Jedoch kreuzreagierten einzelne mAk der "Wisconsin-Gruppe" beim ELISA der "Rudgers-FDA-Gruppe". Die Autoren (Thompson et al., 1985) erklären diese Phänomene mit verschiedenen Affinitäten der mAk in den verschiedenen Testsystemen. Da RIA und ELISA aber prinzipiell die gleiche Sensitivität besitzen (Thompson et al., 1986), muß diese Erklärung kritisch betrachtet werden.

An der University of Minnesota produzierten Edwin et al. (1984) mAk gegen SEA. Die Mäuse wurden nur mit SEA immunisiert, die Bezeichnung der gewonnenen mAk erfolgte mit B₂I, B₂II, C₃ und C₅. Als screening-Test verwendeten sie einen indirekten ELISA und bestätigten die Spezifität für SEA im Western-Blot. Im indirekten ELISA zeigten sie schwache Reaktionen mit gereinigtem SEB, SEC₁ und SED, jedoch eine etwas stärkere Reaktion mit SEE; letztere war auf restliches Protein A, das regelmäßig von *S. aureus* gebildet wird, zurückzuführen. Deswegen wurden die Toxine affinitätschromatographisch von Protein A gereinigt (normales Kaninchen-IgG an Sepharose 4B als Ligand) und die mAk im Western-Blot erneut getestet. Die mAk zeigten spezifische Kreuzreaktionen mit allen SE, wobei ihre Bindung an die Gruppe SEB, SEC₁ und SED sich als weiterhin schwach erwies (Edwin et al, 1984, 1986a).

Notermans et al. (1987) veröffentlichten unter anderem zwei monospezifische mAk gegen SEB. Einer davon, mAk (337.3.3) neutralisierte SEB bei zwei Affen (Fütterungstest mit emetischer Dosis), der andere mAk (322.1.2) war in einem von zwei Fällen neutralisierend. Den Autoren zufolge kann aber daraus nicht geschlossen werden, daß die mAk an die sogenannte "biological site" (toxogene Stelle) des Toxins binden, da eine epitopnahe Bindung auch zu Konformationsänderungen mit gleichem Effekt führen kann.

3. Eigene Untersuchungen

3.1 MATERIAL UND METHODEN

3.1.1. Verzeichnis der regelmäßig verwendeten Materialien

Zellkulturmedium: Dulbecco's Modification of Eagles Medium (Dulbecco)
(Fa. Merck, Darmstadt)

Mediumzusätze: 1. Antibiotika

Amphotericin B (5 mg/l, Squibb, von Heyden, Wien)

Bykomycin (100 mg/l, Byk Gulden, Konstanz)

Penicillin G (100 000 I.U./l, Höchst, Frankfurt)

Streptothemat (125 mg/l, Grünenthal, Stolberg)

Tylosin (8 mg/l, Sigma, München)

2. Vitaminlösung (MEM IV)

3. Mercaptoäthanol ($5 \cdot 10^{-5}$ mol, Serva, Heidelberg)

4. Natriumbicarbonat (8,8%) zum Puffern der Medien

5. Fötales Kälberserum (FKS) (Biochrom, Berlin)

6. Nicht-Essentielle-Aminosäuren (NEA) (Biochrom, Berlin)

7. Selektivmedien

Hypoxanthin/Aminopterin/Thymidin (HAT)

(50x) (Sigma, Deisenhofen)

Hypoxanthin/Thymidin (HT) (50x)

(Sigma, Deisenhofen)

Serumfreies Zellkulturmedium (sf-Dulbecco): Medium ohne FKS-Zusatz

Freund'sches Adjuvans, komplett und inkomplett (FA und IFA)

(Difco, Detroit, Michigan, USA)

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS, ohne Ca /Mg):

8 g NaCl; 0,2 g KCl; 0,2 g KH_2PO_4 ;

2,14 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ ad 1000 ml Aqua dest.

Natrium-Phosphat-Puffer (NaCl-P-P):

8 g NaCl; 0,2 g KH_2PO_4 ; 0,2 g KCl;

2,9 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ ad 1000 ml Aqua dest.

Polyethylenglycol (PEG) 1500 für die Zellfusion (Böhringer, Mannheim)

Tween 20 (Merck, München)

3.1.2. Toxinmaterial

Die SE für diese Arbeit wurden vom Institut für Hygiene und Technologie der Milch (Lehrstuhl: Professor Dr. G. Terplan) der Tierärztlichen Fakultät der Universität München zur Verfügung gestellt. Die Produktion der Enterotoxine erfolgte für alle Typen mit Hilfe der "sac-culture-Technik" (Donnelly et al., 1967). Dabei wurden Erlenmeyerkolben (2 l) mit 50 ml einer in 0,01 mol Phosphatpuffer verdünnten Vorkultur der Staph. aureus-Stämme beimpft. In die Kolben war ein Dialyseschlauch mit doppelt konzentrierter Brain-Heart-Infusion Bouillon (B.H.I.) eingehängt. Aus dem Schlauch diffundierten Nährmediumsbestandteile leichter als 15 000 Dalton heraus. Als Schüttelkultur wurden sie dann 48 h lang bei 37 °C inkubiert. Durch anschließendes Zentrifugieren bei 18 000 g über 20 min wurden die Kulturüberstände gewonnen.

Die Enterotoxine wurden folgendermaßen gereinigt:

- SEA: Ionenaustauschchromatographie an Amberlite CG-50 in Anlehnung an Schantz et al. (1972) und Chromatofokussierung in Anlehnung an Ende et al. (1983)
- SEB und SEC_1 nach Ende et al. (1983)
- SED nach Hartung (1986)
- SEE nach Jung (1988).

Die gereinigten SE zeigten bei der Untersuchung im Objektträger-Gel-Diffusionstest (Sommerfeld und Terplan, 1975) keine Kreuzreaktionen mit heterologen Antiseren. Bei der Reinheitsüberprüfung in horizontalen, ultradünnen Polyacrylamidgelen ($T = 7,5 - 22,5\%$, $C = 3\%$) nach Görg et al. (1981, 1982) ergab sich für alle Enterotoxinpräparate, daß nur monomeres Material im Molekulargewichtsbereich von ca. 30 000 Dalton vorlag. Die Proteinbestimmung erfolgte photometrisch wie in den oben genannten Arbeiten angegeben.

Die Enterotoxine SEC_2 (Stamm 361 und 493) und SEC_3 (Sammlung Bergdoll) standen als Kulturfiltrat zur Verfügung, das ebenfalls mit Hilfe der "sac-culture-Technik" (Donnelly et al., 1967) gewonnen wurde.

Die für die Erstellung des screening-ELISA (vergl. 3.1.5.1.) erforderlichen Referenztoxine bzw. SE-Antiseren stammten von der Fa. Serva (Heidelberg).

3.1.3. Herstellung monoklonaler Antikörper

3.1.3.1. Immunisierung der Mäuse

Die Immunisierung der 7 Wochen alten, weiblichen Balb/c Mäuse erfolgte nach dem Immunisierungsschema von Bergdoll (Thompson et al., 1985):

	SEB	SEC_1
Tag 0	1µg SEB gelöst in 100µl PBS und emulgiert in 100µl kompletten Freund' schen Adjuvans (1µg SEB/100µl PBS/ 100µl FA)	-----

1. Woche	5µg SEB/100µl PBS/ 100µl FA	5µg SEC ₁ /100µl PBS/ 100µl FA
2. Woche	10µg SEB/100µl PBS/ 100µl FA	10µg SEC ₁ /100µl PBS/ 100µl FA
3. Woche	20µg SEB/100µl PBS/ 100µl FA	20µg SEC ₁ /100µl PBS/ 100µl FA
5 Tage danach	Serumantikörpertiterbestimmung im ELISA	
7. Woche	20µg SEB/100µl PBS/ 100µl IFA	20µl SEC ₁ /100µl PBS/ 100µl IFA
11. Woche	40µg SEB/100µl PBS	40µl SEC ₁ /100µl PBS
3 Tage danach	Töten der Maus, Splenektomie und Fusion	

Da SEB in der 5µg-Dosis toxisch wirken kann (Thompson et al., 1985), ist der niedrigere Einstieg mit 1 µg/Maus notwendig. Dadurch verlängert sich bei SEB die Immunisierungsdauer um eine Woche. Trotz dieser Maßnahme wogen die mit SEB immunisierten Mäuse zum Fusionszeitpunkt im Durchschnitt 22,9 g im Gegensatz zum Durchschnittsgewicht von ca. 30 g gleichaltriger, unbehandelter, weiblicher Tiere. Je Toxintyp wurden zwei Gruppen mit je drei Mäusen im Abstand von vier Wochen immunisiert, alle Injektionen erfolgten intraperitoneal.

3.1.3.2. Kultivierung von Myelomzellen

Alle Fusionen wurden mit einem Subklon der Mäusemyelomzelllinie P3-X63-Ag8. durchgeführt, der von Kearny et al. (1975) isoliert und als X63-Ag8.653 bezeichnet wurde. Die Kultivierung erfolgte in 175 cm² Zellkulturflaschen (wenn nicht anders vermerkt alle Zellkulturflaschen von Flow Laboratories, Meckenheim) in einem mit 5% CO₂ begastem Brutschrank bei 37° C in Dulbecco/10% FKS. Mediumwechsel war gewöhnlich freitags und montags, dabei wurden die adhärenent wachsenden Zellen 1:3 bis 1:5 geteilt, die im Überstand schwimmenden Zellen wurden vorher abgenommen. Das weitere Arbeiten mit adhärenenten Zellen wurde so vor allem durch die bessere Beurteilbarkeit erleichtert.

3.1.3.3. Zellfusion

Die ursprüngliche Fusionstechnik für antikörperproduzierende Hybridomzellen von Köhler und Milstein (1975) mit inaktiviertem Sendalvirus als Fusionsvermittler wurde in der Zwischenzeit vielfach variiert und verbessert. Die in dieser Arbeit verwendete Technik der Zellfusion erfolgte nach Czerny (1986) und wurde in einigen Punkten abgewandelt.

Aufbereitung der Milz

Die Tötung einer immunisierten Maus erfolgte nach einer Hypnodil-Narkose (1 : 1 verdünnt mit Aqua dest.; 0,06 - 0,08 ml je Maus) durch Entbluten. Das daraus gewonnene Serum wird im weiteren als Fusionsmausserum (FMS) bezeichnet und diente nach Bestimmung des Enterotoxin-Ak-Titers als Positivkontrolle für den Ak-ELISA (3.1.5.1.). Sofort danach wurde die Milz unter sterilen Bedingungen entnommen, in 10 ml serumfreien (sf)-Dulbecco gewaschen, und mit dem Stempel einer 10 ml

Spritze auf einem Drahtnetz (Porenweite 0,5 mm) zerrieben. Die gewonnene Milzzellsuspension wurde in ein Zentrifugenröhrchen über zweilagige Gaze dekantiert, 8 min bei 500 g zentrifugiert und das Zellsediment in 10 ml sf-Medium resuspendiert. Mit 0,1 ml dieser Suspension wurde eine Vitalfärbung und Zellzählung mittels Trypanblau (0,5% in 0,9%-NaCl-Lösung) in einer Thoma-Zählkammer durchgeführt.

Vorbereitung der Myelomazellen

Das Medium von zwei dichtgewachsenen 175 cm²-Zellkulturflaschen wurde sowohl 24 h als auch 4 h vor der Fusion ohne Zellverdünnung gewechselt. Zur Fusion wurden die Zellen dann suspendiert, in Zentrifugenröhrchen verteilt und bei 500 g 8 min lang zentrifugiert. Das Zellsediment wurde in sf-Dulbecco resuspendiert und die Zellen analog den Milzzellen gezählt.

Fusion

Die Milz- und Myelomazellen wurden im Verhältnis 3 - 5 : 1 gemischt ($1 - 1,5 \cdot 10^8$: $3 \cdot 10^7$) und 8 min lang bei 200 g zentrifugiert. Der Überstand wurde vollständig abgesaugt, das Pellet mit Fingerschnippen etwas gelockert und auf das Zellsediment 1 ml 37° C warmes Polyethylenglykoll (PEG) 1500 für die Zellsuspension (Fa. Boehringer, Mannheim) pipettiert. Nach vorsichtigem Resuspendieren konnte das PEG 1 min lang einwirken. Dann wurde es tropfenweise mit 14 ml sf-Dulbecco ausverdünnt: in der ersten Minute Zugabe von 1 ml, in der 2. Minute Zugabe von 2 ml und in der 3. und 4. Minute Zugabe des Rests. Diese Zellsuspension wurde für 15 min Ruhe in den Brutschrank gestellt, dann für 6 min bei 200 g zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und die Zellen in 15 ml HAT-Medium/20% FKS (Selektivmedium) aufgenommen und wiederum im Zentrifugenröhrchen in den Brutschrank gestellt.

Anschließend wurden die als "feeder-layer" dienenden Peritonealmakrophagen (MP) nach der Methode von Fazekas et al. (1980) frisch gewonnen. In der Regel genügten die MP einer Maus (2.4×10^7 Zellen, das entspricht 4×10^5 Zellen/ml), die in 45 ml HAT-Medium aufgenommen und mit den Fusionszellen zu einer Zellsuspension vereinigt wurden (Gesamtvolumen: 60 ml). Diese wurde auf 6 Mikrotiterplatten der F-Form (Fa. Becton & Dickinson, Heidelberg) verteilt (0,1 ml/Loch) und bei 37°C im Brutschrank (5%-ige CO_2 -Luft-Atmosphäre) inkubiert.

3.1.3.4. Kultivierung von Hybridomzellen

Einmal pro Woche wurden je Vertiefung 0,05 bis 0,1 ml des Mediums gewechselt. Nach 14 Tagen, als nicht fusionierte Milz- und Myelomazellen abgestorben waren, wurde zuerst auf HT- und dann auf Dulbecco-Medium umgestellt.

Zum gleichen Zeitpunkt wurde die Fusion zum ersten Mal auf Ak-Produktion getestet (screening-ELISA siehe 3.1.5.1.1.) und die positiven, gut wachsenden Kolonien von der Mikrotiterplatte mittels Mikropipette unter Vorgabe von MP (5×10^4 /ml und Loch) auf Linbroplatten (Fa. Flow Laboratories, Meckenheim) versetzt. Die auf der Linbroplatte gut wachsenden und ebenfalls gut Ak-produzierenden Kolonien wurden, sobald die Wachstumsfläche zu einem Drittel beziehungsweise bis zur Hälfte zugewachsen war, mit der limiting-dilution-Technik kloniert.

3.1.3.5. Klonierung

Kolonien von antikörperproduzierenden Hybridomas wurden mit der limiting-dilution-Technik kloniert. Nach dem Suspendieren und Zählen der Hybridomas wurde mit Dulbecco/20%FKS eine Suspension von $1 \cdot 10^4$ Zellen/ml hergestellt. Davon wurde die folgende Verdünnungsreihe erstellt.

a)	9ml Dulbecco/20%FKS	+ 1ml Hybridomasuspension	=	$1 \cdot 10^3$ Zellen/ml
b)	9ml	- " -	+ 1ml Verdünnung a)	= $1 \cdot 10^2$ Zellen/ml
c)	9ml	- " -	+ 1ml Verdünnung b)	= 10 Zellen/ml
				= 1 Zelle/100µl
d)	7ml	- " -	+ 3ml Verdünnung b)	= 30 Zellen/ml
				= 3 Zellen/100µl

Die Verdünnungen c) und d) wurden in 100 µl Portionen auf je eine Mikrotiterplatte eingesät. Die dafür verwendeten Mikrotiterplatten waren am Tag davor mit MP beschickt und inkubiert worden (je Vertiefung 100 µl, $5 \cdot 10^4$ MP/ml). Nach 10 bis 14 Tagen erschütterungsfreier Inkubation bei 37°C im CO₂-Brutschrank wurden die Platten mikroskopisch durchgemustert und nur die Zellkulturüberstände der Löcher, in denen nur eine Kolonie gewachsen war, wurden auf das Vorhandensein von Ak im ELISA untersucht. Dabei interessierte nur ein Plus-Minus-Ergebnis. Positive Klone wurden dann erneut in Linbroplatten mit Makrophagen als "feeder-cells" vermehrt.

Die schrittweise Weitervermehrung erfolgte je nach Wachstumsverhalten zunächst in zwei und vier Löchern der Linbroplatte, dann in 75 cm²-Zellkulturflaschen mit Makrophagen und schließlich in 175 cm²-Zellkulturflaschen, bei denen meist keine MP mehr nötig waren. Auch wurde das FKS stufenweise auf 10% verringert.

3.1.3.6. Produktion von Ascites

Die Produktion größerer Mengen mAk erfolgt in der Massenzellkultur oder im Ascitestumor mittels intraperitoneal applizierten Hybridomzellen in syngenesischen Mäusen. Mit einem Ascitestumor können wesentlich höhere Ak-Konzentrationen als in der Zellkultur (bis 100 fache Steigerung) erreicht werden. Sie enthalten im günstigsten Fall bis zu 20 mg Ak/ml. Pro Maus können im besten Fall durch mehrmalige Punktion 10 bis 15 ml Ascitesflüssigkeit gewonnen werden (Peters et al., 1985). Sie ist jedoch mit mauseigenen Serumproteinen, z.B. Albumin, Immunmediatoren und Transferrin kontaminiert.

Eine immunsuppressive Vorbehandlung der Ascites-Mäuse erfolgte sieben bis zehn Tage vor der Inokulation der Hybridomzellen mit 0,8 ml Pristan (2,6,10,14-Tetramethylpentadecan, Aldrich Chemie, Steinheim) je Maus intraperitoneal. Als Hybridominokulum dienten $1 \cdot 10^6$ bis $1 \cdot 10^7$ Zellen in 1 ml sf-Medium pro Maus. Je Klon wurden zwei Mäuse injiziert. Nach frühestens einer Woche entwickelten sich Ascitestumore, erkennbar an den stark geschwollenen Bäuchen. Nach Punktion der Bauchhöhle mit einer Kanüle (ohne Spritze) wurde die Ascitesflüssigkeit unter sterilen Bedingungen in ein Zentrifugenröhrchen ausgetropft. Die Punktion konnte bis zu fünf mal im Abstand von ein bis zwei Tagen wiederholt werden. Die Asciteszellen wurden bei 200 g 15 min pelletiert und je nach Bedarf eingefroren, in Zellkultur gebracht oder verworfen. Der Überstand wurde anschließend geklärt (800 g ,15 min) und bei -20°C aufbewahrt.

Um Asciteszellen in Kultur zu bringen, wurde das Zellpellet in 10 ml Dulbecco/20% FKS resuspendiert und in eine 25 cm² Zellkulturflasche (Fa. Becton & Dickinson, Heidelberg) ausgesät. Wichtig war frühzeitiger Mediumwechsel (z.T. schon nach einem halben Tag) und möglicherweise Ausverdünnung der Zellen oder Abnahme des sehr trüben Überstandes.

Falls durch die Punktion unwissentlich Kontaminationen zustande kamen, wurden diese immer durch die mitabgenommenen Makrophagen, Immunglobuline und Mediatoren eliminiert, da alle Asciteskulturen steril blieben.

3.1.3.7. Gewinnen von serumfreien Hybridomkulturüberständen

Serumfreie Kultur von Hybridomzellen ist die einzige Möglichkeit, um mAk zu produzieren, die keine anderen Immunglobuline enthalten, (auch FKS enthält Rinder-IgG).

Dazu wurden die Hybridomzellen aus den Kulturen, sehr oft Asciteszellkulturen, einmal zentrifugiert (200 g, 10 min), dann in sf-Medium resuspendiert, nochmals zentrifugiert (gewaschen), in sf-Medium in neuen Zellkulturflaschen ausgesät und bis zum Absterben der Kultur bei 37° C, 5% CO₂ inkubiert. Dies konnte bis zu einer Woche dauern. Durch erneutes Zentrifugieren wurde der sf-Ak-haltige-Überstand gewonnen und bei -20° C aufbewahrt.

3.1.3.8. Konservierung der Zellen

Die Myelom- und Hybridomzellen wurden in regelmäßigen Abständen durch Einfrieren konserviert. $5 \cdot 10^6$ Zellen wurden in 1 ml Dulbecco, das einen Zusatz von 20% FKS und 7% DMSO (Dimethylsulfoxid, Fa. Serva, Heidelberg) enthielt, aufgenommen, in ein Einfriergefäß der Fa. Nunc gefüllt, bei 4°C vier Stunden vorgekühlt und anschließend bei -70°C eingefroren. Nach weiteren 24 h erfolgte die Lagerung in flüssigem Stickstoff (-196°C).

Das Auftauen der Zellen erfolgte schockartig in einem Wasserbad von 37°C. Zum Entfernen des DMSO wurde das aufgetaute Medium mit ca. 40 ml vorgewärmten Medium ausverdünn und anschließend abzentrifugiert (200 g, 10 min). Das Zellpellet in Dulbecco/20% FKS aufgenommen und in einer Zellkulturflasche ausgesät (25 cm²). Oft erhielten die Hybridomas außerdem noch MP als "feeder-layer".

3.1.4 Reinigung monoklonaler Antikörper

Für die weiteren im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen war eine Reinigung der mAk nötig, wenn sie in Ascitesflüssigkeit vorlagen. Durch die vorgenommenen Reinigungsschritte sollte weitmöglichst gewährleistet sein, daß bei der Biotinmarkierung der mAk (vergl. 3.1.4.) keine weiteren Ascitesproteine zusätzlich markiert werden und bei der Proteinbestimmung nach Lowry (vergl. 3.1.4.1.) möglichst nur Immunglobuline erfasst werden. Eine Erleichterung der Reinigung war dadurch gegeben, daß keiner der Klone der sehr empfindlichen Immunglobulinklasse IgM angehörte.

3.1.4.1. Protein-Affinitätschromatographie

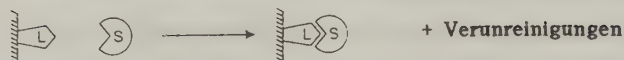
Die Affinitätschromatographie der Ascitesflüssigkeit, so wie sie hier durchgeführt wurde, beschränkt die Kontamination mit Fremdproteinen auf mauseigene Immunglobuline, z.B. Anti-Idiotyp-Antikörper.

Die Grundlage der Affinitätschromatographie ist erstens das Vorhandensein eines an die Trägermatrix gebundenen Liganden, der dem zu reinigenden Substrat gegenüber eine spezifische und reversible Bindungsaffinität besitzt. Die zweite Voraussetzung ist die Möglichkeit, gebundene Substanzen selektiv zu desorbieren.

Immobilisierung des Liganden (L)



Adsorption der Probensubstanz (S)



Desorption gebundener Probensubstanz

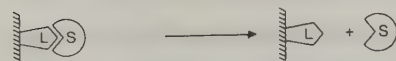


Abbildung 1: Prinzip der Affinitätschromatographie (nach "Affinity Chromatography", Handbuch der Fa. Pharmacia, Uppsala, Schweden).

Der Ligand Protein A, ein extrazelluläres oder auch zellwandständiges Produkt von 95% der humanpathogenen Stämme von *S. aureus* (Peters et al., 1985) besitzt starke gruppenspezifische Affinität zum Fc-Teil der Immunglobuline. Dabei beeinflusst die Interaktion der Immunglobuline mit Protein A nicht die Antigenbindungsstelle. Deshalb erfolgt eine einfache affinitätschromatographische Abtrennung von Maus IgG aus Ascitesflüssigkeit über die Protein A-Chromatographie (Forsgren und Sjoquist, 1966; Langone, 1982; Ey et al., 1978). Die Bindung an Protein A der Maus-IgG-Subklassen ist pH-abhängig. Dies kann für eine subklassenspezifische, stufenweise oder totale, einphasige Elution (Desorption) der gebundenen Ak genutzt werden. Für mAk genügt es mit einem Elutionspuffer zu arbeiten, der alle Subklassen erfäßt.

Stufengradient zur Elution von polyklonalen Maus Immunglobulin-Subklassen nach Seppälä et al. (1981):

ph	Ig-Klasse
8 - 8,6	IgA, IgE, IgM
6 - 8	IgG ₁
4,5 - 6	IgG _{2a} , IgG ₃
3,5 - 4,5	IgG _{2b}

Material :

Protein A-Sepharose Cl-4B (Fa. Pharmacia, Freiburg)

Waschpuffer A : 0,05 M Tris-HCl pH 8,0 - 8,6

0,15 M NaCl

0,002% Thimerosal (Fa. Sigma, München)

Elutionspuffer B: 0,1 M Glycin-HCl pH 3,0

Chromatographiesäule C 10/10 mit Adapter (Fa. Pharmacia, Freiburg)

Kühlbox mit Peristaltikpumpe, Fraktionssammler, UV-Monitor,

Flachbett-Schreiber (alle Geräte von LKB, München).

Die Protein A-Sepharose (1,5 g) wurden in 50 ml Waschpuffer A gelöst und konnte 15 min lang im Wasserbad quellen. Anschließend wurde die Lösung über einen gesinterten Glasfilter filtriert und mit 200 ml Puffer A gewaschen und äquilibriert, wieder mit Puffer A ausverdünnt und luftblasenfrei in die Säule gefüllt. Die zu reinigende Ascitesflüssigkeit wurde in 1 - 2 ml Portionen, versetzt mit 1/10 des Volumens des 10 fach konzentrierten Puffers A, mit einer Flußrate von ca. 0,5 ml/min und einem zwischengeschalteten Sterilfilter mit Porengröße 45 µm (Fa. Sartorius, Göttingen) aufgetragen. Die Säule wurde mit weiteren 10 Säulenvolumen Puffer A gewaschen, bis die Transmission auf dem Schreiber

wieder dem Ausgangspunkt entsprach. Anschließend erfolgte die Elution mit Puffer B. Die Fraktionen, die dem aufgezeigten Peak entsprachen, wurden gepoolt, mit der Ammoniumsulfatfällung (vergl. 3.1.4.2.) eingengt und im ELISA getestet.

3.1.4.2. Ammoniumsulfatfällung und Dialyse

Die Eluate der Protein A-Säule wurden durch Aussalzen konzentriert. Dazu wurden die Eluate mit dem gleichen Volumen gesättigter Ammoniumsulfatlösung (654 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ /l H_2O) gemischt und 30 min bei 4°C stehengelassen. Anschließend wurde 30 min bei 2000 g zentrifugiert und das Proteinpräzipitat in 1 ml PBS gelöst. Diese Lösung wurde in einen Dialyseschlauch (Fa. Serva, Heidelberg) gefüllt, der vorher in PBS kurz aufgeköcht wurde, und solange bei 4°C gegen PBS dialysiert, bis im Außendialysat keine Sulfat-Ionen mehr durch Bariumchlorid (BaCl_2) nachweisbar war. Dafür genügte in der Regel eine Dialyse von 2 * 8 h. Für den BaCl_2 -Nachweis wurden 5 ml Außendialysat mit 2 N HCl angesäuert (pH 3,0) und mit 3 Tropfen 10% BaCl_2 -Lösung versetzt. Das schwerlösliche BaSO_4 fiel als weißer Niederschlag aus.

Die gereinigten und dialysierten Lösungen wurden bei -20°C aufbewahrt.

3.1.5. Herstellung von Biotinkonjugaten mit monoklonalen Antikörpern

Für die Charakterisierung der mAk (vergl. 3.1.5.4.) war es notwendig, im ELISA einsetzbare Antikörperkonjugate herzustellen.

3.1.5 .1. Proteinbestimmung nach Lowry

Die Proteinbestimmung der mAk-Lösungen wurde modifiziert nach Lowry et al. (1951) durchgeführt.

Es waren vier Stammlösungen erforderlich:

Lsg. A: Natriumcarbonatlösung(20 g Na_2CO_3 wasserfrei + 50 ml 2 n NaOH
ad 1 l A. dest.)

Lsg. B: Kupfersulfatlösung (1%)

Lsg. C: Kalium-Natriumtartratlösung (2%)

Lsg. D: Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz (1 : 2 verdünnt in A. dest.,
Fa. Merck, Darmstadt)

Aus den Stammlösungen A, B und C wurde die Gebrauchslösung E immer frisch hergestellt. Lösung E entstand aus 50 ml von Lsg. A und je 0,5 ml der Lösungen B und C.

Als Standard diente Bovines Serum Albumin (BSA, Fa. Behringwerke, Marburg). Ausgehend von einer 0,05% BSA-Lösung wurde folgende Standard-Verdünnungsreihe im Doppelansatz hergestellt:

Glas #	0,05% BSA-Lsg.	A. dest.	entspricht $\mu\text{g}/200\mu\text{l}$
0	---	1,00 ml	0
1	1 ml	----	100
2	1 ml	0,10 ml	91
3	1 ml	0,25 ml	80
4	1 ml	0,50 ml	66,7
5	1 ml	1,00 ml	50
6	1 ml	2,00 ml	33,3
7	1 ml	3,00 ml	25
8	1 ml	5,00 ml	16,6
9	1 ml	7,00 ml	12,6
10	1 ml	9,00 ml	10

Die zu untersuchenden Proben (gereinigte, eingeeengte und dialysierte mAk-Lösungen aus Ascites) wurden 1 : 10, 1 : 20 und 1 : 50 in A.dest. verdünnt. Von jeder Standard- und jeder Probenverdünnung wurden je 0,2 ml in Makroküvetten (Nr. 1101, Fa. Ratiolab, Dreieich) pipettiert, 2 ml von Lsg. E pro Röhrchen zugesetzt, homogenisiert und 10 min stehen gelassen. Danach erfolgte die Zugabe von je 0,2 ml der Folinreagenzverdünnung, erneutes Homogenisieren und 30 min Inkubation bei 37°C. Die Proben wurden sofort anschließend in der Makroküvette gegen den Leerwert bei 578 nm gemessen (Spektrophotometer Modell 35, Fa. Beckmann, München). Mit den Ergebnissen der Standardverdünnung wurde eine Kalibrierungskurve erstellt und berechnet.

3.1.5.2. Biotinylierung monoklonaler Antikörper

Die Biotinylierung erfolgte nach der Anleitung von Peters et al. (1985) mit Modifikationen von Czerny (persönl. Mitteil., 1987).

Material

Kupplungspuffer: 100 mM Natriumhydrogencarbonat pH 7,7

Entsalzungspuffer: 100 mM Natriumacetat, 200 mM Natriumchlorid pH 5,0

Entsalzungssäule: Sephadex G-25 Fine (Fa. Pharmacia, Freiburg)

Biotin-X-NHS (Fa. Calbiochem, Frankfurt a. M.)

Bei den gereinigten, eingeeengten und dialysierten mAk wurde der Protein-gehalt bestimmt (vergl. 3.1.5.1.) und die Konzentration auf 1 mg/ml in PBS eingestellt. Über Nacht wurden diese Ak-Lösungen gegen den Kupplungspuffer dialysiert. Zur Kupplung wurde das Biotin-X-NHS unmittelbar vor der Reaktion in N, N - Dimethylformamid (Fa. Merck, Darmstadt) ad 1 mg/ml gelöst. 50 µl dieser Biotin-X-NHS-Lösung wurden

zu 1 ml Ak-Lösung gegeben und die Reaktion nach 30 min bei Raumtemperatur gestoppt, indem die Reaktionsprodukte über die Entsalzungssäule getrennt wurden.

Für die Entsalzungssäule wurden 10 g Sephadex G-25 Fine in 100 ml Entsalzungspuffer 3 h bei Raumtemperatur gequollen und in 2 ml-Spritzen mit Filterpapierboden gefüllt. Zum Abblocken unspezifischer Proteinbindungsstellen wurde mit 3 fachem Säulenvolumen Entsalzungspuffer/10% FKS gewaschen und die Säulen in Zentrifugenröhrchen 5 min bei 200 g trocken zentrifugiert. Die Konjugate wurden zu Portionen von je 0,33 ml und Säule aufgetragen und erneut zentrifugiert (200 g, 5 min). Die Eluate wurden gepoolt und über Nacht bei 4°C gegen PBS/0,1% Natriumazid (Fa. Merck, Darmstadt) dialysiert, im ELISA getestet (vergl. 3.1.5.1.3.) und bei -20°C gelagert.

Die folgende Abbildung (Abb. 2) soll über den Reaktionsverlauf der oben beschriebenen Biotinylierung informieren. Die im ELISA zu erfolgende Bindung von Biotin an Streptavidin (vergl. 3.1.5.1.3.) stößt auf sterische Schwierigkeiten, wenn das Biotin direkt an den mAk gekoppelt wird. (Peters et al., 1985). Da sich ein aliphatischer Rest (z.B. epsilon-Aminocaprinsäure) zwischen dem Biotin und dem Protein einbauen läßt (Costello et al., 1979), eignet sich die Methode nach Guesdon (1979). Kurz zusammengefaßt hydrolysiert der Biotin-epsilon-aminocaprinsäure-N-hydroxysuccinimidester (Bioti-X-NHS) spontan bei der Zugabe zum Protein (mAk) im Kupplungspuffer und das Biotin-X koppelt über eine kovalente Peptidbindung an die epsilon-Aminogruppen der Antikörper (Peters et al., 1985).

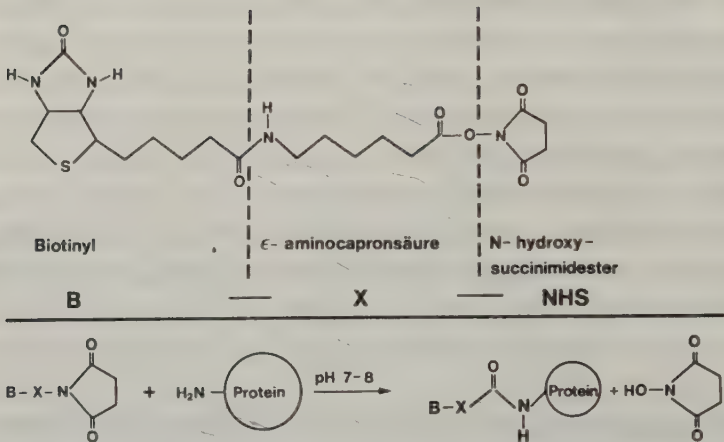


Abbildung 2: Schema der Biotinylierung mit dem Biotin-X-Succinimidester
(nach Peters et al., 1985)

3.1.6. Charakterisierung monoklonaler Antikörper

3.1.6.1. Nachweis der Staphylokokken-Enterotoxin-B / C₁ - Spezifität der Monoklonalen Antikörper

Vor der Durchführung der ersten Fusion wurde ein ELISA-Test zum Nachweis der Antikörperproduktion aufgestellt. Der ELISA eignet sich sehr gut als Suchtest (screening) für große Probenzahlen. Außerdem selektiert

Jedes Testsystem aus der Menge der antigenspezifischen mAk den bestimmten Teil der mAk, der in diesem Test besonders gut reagiert (Peters et al., 1985). So unterstützt der hier verwendete screening-Test die Verwendung der mAk in einem zukünftigen ELISA zum Nachweis der Staphylokokken-Enterotoxine.

Für alle Ak-Nachweise wurde der indirekte ELISA gewählt.

3.1.6.1.1. Nachweis in Hybridomkulturen

Der ELISA wurde nach Thompson et al. (1985) und Meyer et al. (1984) mit einigen Modifikationen durchgeführt.

96-Loch-Platten aus Immunolon für ELISA (M129A von Fa. Dynatech, Plochingen) wurden je Vertiefung mit 100 µl Toxinlösung zu 1 µg/ml in PBS, pH 8,0, gefüllt und zuerst 3h bei 37°C und dann über Nacht bei 4°C beschichtet. Die Platten konnten dann bei -20°C eingefroren werden, oder wurden zum Test verwendet. Sie wurden fünfmal mit NaCl-P-P/0,05% Tween gewaschen und anschließend erfolgte die Beschickung der Vertiefungen mit in log-2-Schritten in ungebrauchtem Zellkulturmedium/10% FKS verdünnten Hybridomüberständen (100 µl, Ausgangsverdünnung 1 : 1) und anschließende Inkubation bei 37°C während 60 min. Als Positivkontrolle lief jeweils ein Anti-SEC₁ bzw. Anti-SEB-Serum vom Kaninchen (Fa. Serva, Heidelberg) oder später ein als positiv getestetes FMS (Ausgangsverdünnung 1 : 100) mit. Als Negativkontrolle diente unspezifisches, sogenanntes Normalmausserum und/oder Dulbecco/10% FKS. Nach weiterem viermaligem Waschen wurden die Platten mit jeweils 100 µl je Loch Anti-Maus- bzw. Anti-Kaninchen-Meerrettichperoxidase-Konjugat in 1 : 1000 bzw. 1 : 3000-Verdünnung mit NaCl-P-P/5% FKS beschickt und

30 min bei Raumtemperatur stehengelassen (Rabbit-anti-mouse/PO von Dako, Dänemark; Goat-anti-rabbit/PO von Nordic, Tilburg, Niederlande). Danach wurde fünfmal gewaschen und je 100 µl TMB (s.u.) in die Löcher gefüllt und 10 min bei Raumtemperatur und unter Schütteln inkubiert. Die Reaktion wurde mit je 50 µl 2 M Schwefelsäure gestoppt und die optische Dichte bei 450 nm mit einem Multiscan-Photometer (Fa. Flow Laboratories, Meckenheim) gemessen.

Als Antikörpertiter der untersuchten Probe wurde die höchste Verdünnungsstufe angesehen, bei der noch ein Wert der optischen Dichte von 0,15 oder höher gemessen wurde, und ein Einsatz desselben mAk im Leerplatten-ELISA (ELISA auf leere Platte, d.h. ohne Toxinbeschichtung) keinen Meßwert über 0,15 erbrachte (Ausschluß vom sogenannten sticky-effect).

Herstellung des Substrates:

Von TMB (3,3',5,5'-Tetramethyl-Benzidine, Fa. Serva, Heidelberg) wurden 100 mg in 100 ml DMSO gelöst, diese Lösung kann bei -20°C eingefroren werden. Davon ergaben 0,2 ml mit 10 ml A. dest.; 9,9 ml 0,2 M Natriumazetat; 0,1 ml 0,2 M Natriumcitrat und 24 µl Wasserstoffperoxyd (Fa. Merck, Darmstadt, 1 : 10 verdünnt) die gebrauchsfertige Substratlösung.

3.1.6.1.2. Nachweis im Serum und in Ascites

Dieser Nachweis von Anti-SEB/Anti-SEC₁-Ak erfolgte wie unter 3.1.5.1.1. beschrieben, nur mit anderen Ausgangsverdünnungen und Verdünnungsvorlagen. Desweiteren mußten für die Ascitesuntersuchungen im ELISA die ELISA-Platten nach der Toxinbeschichtung mit einer 1%-BSA-Lösung gegen unspezifische Bindungen des Ascites geblockt werden. Dazu wurde eine 1%-BSA-Lösung in NaCl-P-P/0,05% Tween 20 hergestellt und die Testplatten mit 100 µl/Vertiefung dieser Blocklösung für eine Stunde bei

Raumtemperatur vor der Test-Antikörperzugabe inkubiert. Nach anschließendem dreimaligen Waschen erfolgten die weiteren Schritte wie unter 3.1.5.1.1. beschrieben.

Für Serum und Ascites wurden folgende Ausgangsverdünnungen und Verdünnungsvorlagen verwendet:

Serum: 1 : 100 in NaCl-P-P/10% FKS

Ascites: 1 : 1000 in NaCl-P-P/10% FKS

3.1.6.1.3.. Nachweis als Biotin-Konjugat

Die (wie unter 3.1.5.1.1. beschriebenen) Toxin-ELISA-Platten wurden aufgetaut, fünfmal gewaschen und die Biotin-Konjugate mit einer Ausgangsverdünnung von 1 : 100 und 1 : 400 in NaCl-P-P/10% FKS titriert, Inkubationsbedingungen wie unter 3.1.5.1.1.. Als Konjugat diente Streptavidin-Meerrettichperoxidase, 1 : 1000 in NaCl-P-P/0,05% Tween (Amersham Buchler, Braunschweig), da Streptavidin hohe Affinität zu Biotin besitzt (Chalet und Wolf, 1964). Diese Konjugatbindungsreaktion wurde 30 min bei Raumtemperatur inkubiert alle weiteren Schritte erfolgten wie unter 3.1.5.1.1..

3.1.6.2. Bestimmung der Immunglobulinklassen und -subklassen

Die Bestimmung erfolgte mittels ELISA. Die Toxin-Platten aus Immunolon (vergl. 3.1.5.1.1.) wurden komplett mit 100µl je Vertiefung sf-Hybridomkulturüberstand, 1 : 1 verdünnt in NaCl-P-P, gefüllt und 1 h bei 37°C bebrütet. Nach viermaligem Waschen wurden die folgenden klassenspezifischen Antikörper aus der Ziege in log 2-Schritten aufgetragen und 60 min bei 37°C inkubiert (Goat-Anti-Mouse-IgA, -IgG₁, -IgG_{2a}, -IgG_{2b}, -IgG₃, IgGM; alle 1 : 100 in NaCl-P-P, Sigma, Deisenhofen). Nach viermaligem Waschen erfolgte der Nachweis der gebundenen Ziegen-Ak mit

einem Anti-Ziege-IgG-Peroxidase-Konjugat (Rabbit-Anti-Goat-IgG/PO, Fa. Sigma, Deisenhofen), Inkubation bei Raumtemperatur 45 min lang, weitere Schritte wie unter 3.1.5.1.1..

3.1.6.3. Nachweis von Kreuzreaktionen der monoklonalen Antikörper mit anderen Staphylokokken-Enterotoxintypen

Zum Nachweis von Kreuzreaktionen der mAk mit anderen Staphylokokken-Enterotoxin-Typen wurden Immunolon-Platten mit den jeweiligen Toxinen, wie schon in 3.1.5.1.1. beschrieben, beschichtet. SEA, SEC₂, SEC₃, SED und SEE wurden vom Institut für Hygiene und Technologie der Milch des Fachbereichs Tiermedizin der Universität München zur Verfügung gestellt. SEA, SED und SEE lagen in gereinigter und konzentrationsbestimmter Form vor (vergl. 3.1.1.1.). SEC₂ von den *S. aureus* Stämmen 361 und 493, sowie SEC₃ (Sammlung Bergdoll) standen nur als Kulturüberstand zur Verfügung. Die Toxinproduktion erfolgte nach der "sac-culture-Technik" von Donnelly et al. (1967); siehe 3.1.2.. Der Toxingehalt der Kulturüberstände wurde nach Angaben des Instituts auf 10 - 20 µg/ml geschätzt. Für die Beschichtung der ELISA-Platten wurden die SEC₂- und SEC₃-Überstände 1 : 20 in PBS pH 8.0 verdünnt. Die anderen Toxinpräparate wurden auf eine Toxinkonzentration von 1 µg/ml eingestellt.

Die Durchführung der ELISA's erfolgte gemäß 3.1.5.1.1.. Als Positivkontrollen dienten vom Institut für Milchhygiene zur Verfügung gestellte Antiseren vom Schaf, IgG-Gehalt 10 µg/ml gegen SEA, SED und SEE. Als Positivkontrolle für SEC₂ und SEC₃ diente Anti-SEC₁-Serum vom Kaninchen (Fa. Sigma, Deisenhofen), das mit diesen Toxinen kreuzreagiert. Um den Einfluß von Interferenzen durch Staphylokokken-Protein A in Kulturüberständen des C₂-Stammes abzuschätzen (Zusammenfassung siehe Schreiner, 1985), wurden zum einen Platten mit den reinen Kulturüberständen beschichtet und zum anderen vor dem Beschichten die Toxinlösung mit 2,5% Kaninchen-Normalserum 30 min bei Raumtemperatur abgesättigt (nach Fey et al., 1984).

3.1.6.4. Kompetitions-ELISA

Über den Kompetitions-ELISA (zwei Ak werden gleichzeitig eingesetzt, nur einer ist enzymmarkiert) kann eine Aussage darüber gemacht werden, ob die mAk unterschiedliche Epitope erkennen und/oder ob sie stark voneinander abweichende Aviditäten zum Antigen besitzen, da diese beiden Charakteristika zusammen das Ergebnis bestimmen.

Die Kompetitions-ELISA's wurden mit einigen Veränderungen nach Peters et al. (1985) durchgeführt, indem auf die Toxin-Platten, (SEB bzw. SEC₁), ein Ak als Biotin-Konjugat gleichzeitig mit unterschiedlichen Mengen des konkurrierenden, nicht enzymmarkierten mAk inkubiert wurde (Reaktionsbedingungen siehe 3.1.5.1.3.). Die Gemische von mAk und mAk-Konjugaten wurden vorher in Mikrotiterplatten hergestellt. In eine Reihe wurde konstant 100 µl mAk-Konjugat in NaCl-P-P/10% FKS vorgelegt, in der nächsten Reihe eine log 2-Verdünnungsreihe des Konkurrenz-Ak mit 100 µl Volumengröße. Mit der Multikanalpipette wurden beide Reihen gemischt und je 100µl auf Toxinplatte bzw. Leerplatte übertragen.

Die optimale Verdünnung des Konjugats wurde im direkten ELISA gegen Toxinplatten ermittelt. Es wurde die Verdünnung gewählt, die dem Rand des Plateaus der ELISA-Meß-Kurve entsprach. Dies war einerseits die größtmögliche Verdünnung mit höchster optischer Dichte und andererseits wird in dieser Verdünnung eine Hemmung der Ak-Bindung an das Toxin wegen Verdrängung durch den anderen Ak, der möglicherweise das gleiche Epitop erkennt, am empfindlichsten sichtbar. Die Beurteilung erfolgte anhand der im Photometer gemessenen Extinktionen des Gemisches aus Konjugat und den einzelnen Verdünnungsstufen des Konkurrenz-Antikörpers (nicht enzymmarkiert). Die Extinktion des Konjugats allein ohne weiteren Hemm-Ak galt als 100%-Extinktion und 0%-Hemmung. Die Extinktionen, die trotz Hemm-Ak in den verschiedenen Verdünnungsstufen

erreicht wurden, wurden dann als prozentualer Wert der 100%-Extinktion umgerechnet. Wurde dieser Wert von 100% (konstanter Faktor) subtrahiert, zeigte sich die prozentuale Verminderung der erreichbaren Extinktion durch den Hemm-Ak. Das Ergebnis dieser Subtraktion galt als erreichte Hemmung, angegeben in Prozent. Als positive Hemm-Kontrolle diente noch zusätzlich der Antikörper, mit dem die Konjugatherstellung erfolgte (Eigenhemmung). Als Vergleichswert zwischen den einzelnen mAk interessierte der Titer, bei dem 50%-Hemmung erreicht wurde.

3.2. ERGEBNISSE

3.2.1. Fusionen und produzierte monoklonale Antikörper

Für jeden der beiden Toxintypen, SEB und SEC₁ sind sechs Mäuse voll-immunisiert worden. Die letzte Boosterung erfolgte jeweils drei Tage vor dem Fusionstermin.

Die erste Fusion mit den Milzzellen einer mit SEC₁ immunisierten Maus (kurz: SEC₁-Fusion) erbrachte nur ein Hybridomkoloniewachstum in 44 von 576 eingesäten Löchern, (7,6%) der sechs Mikrotiterplatten. Alle 44 Kolonien waren antikörpernegativ.

Die zweite SEC₁-Fusion brachte nur 34 bewachsene Löcher (5,8%) hervor, eins davon war anti-SEC₁-positiv und wurde 14 Tage nach der Fusion, als damit bereits vier Linbrolöcher bewachsen waren, kloniert. Von den dabei ursprünglich entstandenen 48 positiven Klonen wurden drei zur Kultivierung ausgewählt; einer davon behielt die Antikörperproduktion und wurde, dann als mAk C₁/2-3 bezeichnet, weiteruntersucht.

Bei der dritten SEC₁-Fusion waren 67% aller Mikrotiterplattenlöcher bewachsen und vier der Kolonien waren antikörperpositiv. Diese wurden 19 Tage nach der Fusion aus der Linbroplatte kloniert und über längere Kultivierungsdauer blieben folgende fünf mAk stabil in Wachstum und Antikörperproduktion: mAk C₁/3-1, C₁/3-3, C₁/3-4, C₁/3-9 und C₁/3-10. Die vierte SEC₁-Fusion brachte 39% bewachsene Mikrotiterplattenlöcher und acht positive Kolonien. Sechs davon wurden 20 Tage nach der Fusion aus 75 cm²-Zellkulturflaschen kloniert und von den Klonierungsprodukten blieb ein Klon stabil: mAk C₁/4-6.

Die Maus für die fünfte Fusion wurde wegen stark beeinträchtigtem Allgemeinbefinden getötet und mit diesen Milzzellen wurde keine Fusion durchgeführt.

Bei der sechsten SEC₁-Maus wurde bei gutem Allgemeinbefinden zum Fusionstermin nur die Milz extirpiert und als Milzzellsuspension aus arbeitstechnischen Gründen zur Reserve eingefroren.

Nach der ersten SEB-Fusion waren fast alle Löcher bewachsen und 16 Kolonien waren im ersten "screening-Test" positiv, sechs Kolonien davon blieben positiv und wurden nach 28 Tagen kloniert, zu diesem Zeitpunkt wurden die meisten Kolonien schon in der 175 cm²-Zellkulturflasche vermehrt. Diese Klonierungen brachten aber keinen einzigen positiven Klon.

Nach der zweiten SEB-Fusion waren 78% der Löcher bewachsen, von vier positiven Kolonien blieben drei positiv und wurden nach 21 Tagen aus jeweils vier bis acht Linbrolöchern kloniert. Diese Klonierungen brachten 24 positive Klone. Je Klonierung wurden drei Klone weiterverfolgt, die aber alle nach zunächst gutem Wachstum im Alter von sieben bis acht Wochen das Wachstum plötzlich einstellten, und wegen des sehr schlechten Zustandes verworfen wurden.

Bei der dritten SEB-Fusion waren 76% der Löcher bewachsen und 55 Kolonien reagierten positiv. Aus arbeitstechnischen Gründen blieben dieses eine Mal die frisch fusionierten Zellen nach der Fusion etwa 1 h zur Ruhe im Brutschrank, bevor sie im HAT-Medium auf Mikrotiterplatten ausgesät wurden; üblicherweise betrug diese Ruhezeit 15 min (vergl. 3.1.2.3.). Sechs Kolonien wurden nach 25 Tagen aus 75 cm²-Zellkulturflaschen kloniert und drei Kolonien wurden zum gleichen Zeitpunkt aus langsam wachsenden Kolonien aus Mikrotiterplatten kloniert. Daraus entstanden 82 positive Klone, sechs davon stammten von einer der langsam wachsenden Kolonien, die anderen zwei Klonierungen der wachstumsschwachen Kolonien blieben erfolglos. Von den 82 Klonen wurden 15 weiterverfolgt und zum Schluß blieben folgende drei aktive und gut wachsenden Klone übrig: mA K B/3-4, B/3-5 und B/3-8.

Die Maus für die vierte SEB-Fusion mußte wegen einem walnußgroßen, bindegewebigen Granulom am linksseitigen Kehlbereich, das zu starker Beeinträchtigung der Atmung führte, getötet werden. Diese Milz wurde nicht zur Fusion verwendet.

Die zwei weiteren geplanten Fusionen wurden ebenfalls nicht durchgeführt, da zu diesem Zeitpunkt die drei oben genannten Klone schon die gewünschten Eigenschaften zeigten. Daher wurden in beiden Fällen zum Fusionszeitpunkt die Milzen extirpiert und als zwei Milzellsuspensionen zur Reserve eingefroren.

Damit wurden sieben Klone gegen SEC₁ und drei Klone gegen SEB entwickelt. Sie wurden als mAk C₁/2-3, C₁/3-1, C₁/3-3, C₁/3-4, C₁/3-9, C₁/3-10 und C₁/4-6; bzw. als mAk B/3-4, B/3-5 und B/3-8 benannt. Bei dieser Benennung bezeichnet der Großbuchstabe das Toxin, mit dem die Fusionsmaus immunisiert wurde, die erste Ziffer die Fusion, in der der mAk produziert wurde, und die zweite Ziffer den Klon. B/3-8 benennt demnach den 8. Klon aus der 3. SEB-Fusion.

Die Serumantikörpertiterbestimmungen der Mäuse nach der Grundimmunisierung, d.h. bei SEC₁ 5 Tage nach der dritten Injektion und bei SEB 5 Tage nach der vierten Injektion, brachten folgende tabellarisch aufgeführten Ergebnisse.

Maus #	SEC ₁	SEB
1	409600	204800
2	204800	n.u.
3	819200	n.u.
4	819200	204800
5	409600	1638400
6	409600	3276800

Tabelle 1: Antikörpertiter der Seren der Fusionsmäuse am 5. Tag nach der dritten (bei SEC₁) bzw. der vierten (bei SEB) Toxininjektion im indirekten ELISA auf toxinbeschichteten Platten. Angegeben sind die reziproken Werte der ELISA-Titer, bei denen die O.D. größer 0,15 war.
n.u.: nicht untersucht

3.2.2. Spezifität der monoklonalen Antikörper zu SEB und SEC₁

Die Spezifitätsnachweis der mAk wurde als Titerbestimmung im indirekten ELISA auf Toxinplatten vorgenommen. Für die Titerbestimmung wurden die unveränderten Zellkulturüberstände genommen. Als positiv wurden alle Extinktionswerte bei 450 nm größer 0,15 angesehen, da Extinktionswerte bis 0,15 dem "Background", bestehend aus Mediumbestandteilen (Fötales Kälberserum) zugerechnet werden können. Gleichzeitig durften die Zellkulturüberstände im Test auf der Leerplatte keine Reaktion zeigen. Da insbesondere der Zeitpunkt, an dem die Zellkulturüberstände gewonnen werden, einen Einfluß auf die Titerhöhe hat, wurden dieselben Tests auch mit standardisierten Biotinkonjugaten und Ascites durchgeführt, vergl. 3.2.5. und 3.2.6..

mAk	SEB		SEC ₁	
	sh	sf	sh	sf
B/3-4	1024	64	---	---
B/3-5	512	32	---	---
B/3-8	4096	2048	---	---
C ₁ /2-3	---	---	1024	128
C ₁ /4-6	---	---	2048	16384
C ₁ /3-1	512	16	4096	64
C ₁ /3-3	256	256	2048	256
C ₁ /3-4	512	256	1024	512
C ₁ /3-9	256	256	1024	256
C ₁ /3-10	1024	256	2048	256

Tabelle 2: Antikörpertiter der monoklonalen Antikörper aus Zellkulturüberständen gegen SEB/SEC₁, ermittelt im indirekten ELISA auf toxinbeschichteten Platten. Angegeben sind die reziproken Werte der ELISA-Titer von Überständen serumhaltiger (sh) und serumfreier Kulturen (sf), deren O.D. größer 0,15 war.

"---": keine Reaktion

3.2.3. Reaktionen der monoklonalen Antikörper mit anderen Staphylokokken-Enterotoxinen

Der Nachweis von Kreuzreaktionen der mAk mit heterologen Staphylokokken-Enterotoxin-Typen wurde analog den Spezifitätstests geführt, wobei nur Zellkulturüberstände verwendet wurden, für die die positive Reaktion mit SEB/SEC₁ abgesichert war.

Keiner der mAk reagierte im indirekten ELISA mit den gereinigten Enterotoxinen SEA, SED und SEE. Die von den jeweiligen Positivkontrollen (spezifische Antiseren vom Schaf) erreichten Titer lagen bei 1 : 512 für

SEA, bei 1 : 256 für SED und bei 1 : 128 für SEE, was die erfolgreiche Bindung der Toxine an die ELISA-Platten beweist.

Wurde unbehandelter SEC₂-haltiger Kulturüberstand auf die ELISA-Platten beschichtet, reagierten im anschließenden indirekten ELISA alle mAk, die Positivkontrolle sowie das Anti-Maus-Peroxidase-Konjugat (vom Kaninchen) deutlich mit der Plattenbeschichtung, die Extinktionswerte in der ersten Verdünnungsstufe lagen zwischen 0,5 für das Konjugat und die mAk sowie 1,9 für die Positivkontrolle.

Wurde für den Test der SEC₂- beziehungsweise SEC₃-haltige Kulturüberstand mit 2,5% Normalem Kaninchenserum 30 min lang bei Raumtemperatur präinkubiert, blieb die Positivkontrolle positiv und zwischen dem Konjugat und der Plattenbeschichtung trat keine Kreuzreaktion mehr auf. Alle Klone reagierten auch gegenüber SEC₂ (Stamm 361 und 493) und SEC₃ negativ.

3.2.4. Bestimmung der Immunglobulinklassen- und subklassen der Staphylokokken-Enterotoxin-Antikörper

Die Klassen- und Subklassenbestimmung der mAk erfolgte im indirekten ELISA. Zur Plattenbeschichtung wurde serumfreier Zellkulturüberstand verwendet, um mögliche Kreuzreaktionen der Immunglobuline aus dem fötalen Kälberserum zu vermeiden. Die Ergebnisse für die Isotypenbestimmung werden in Tabelle 3 dargelegt. Daraus ist zu ersehen, daß alle C₁-Antikörper der Klasse IgG₁ angehören. Ebenso produziert der Klon B/3-4 IgG₁-Antikörper, B/3-5 ist ein IgG_{2b}-Antikörper und B/3-8 ein IgG_{2a}-Antikörper.

mAk	IgG ₁	IgG _{2a}	IgG _{2b}	IgG ₃	IgA	IgM
C ₁ /2-3	1024	2	2	4	32	8
C ₁ /3-1	1024	4	2	< 2	4	4
C ₁ /3-3	2048	2	2	2	4	4
C ₁ /3-4	1024	< 2	2	8	4	2
C ₁ /3-9	512	2	2	2	4	2
C ₁ /3-10	1024	< 2	2	2	4	2
C ₁ /4-6	1024	< 2	4	2	32	< 2
B/3-4	256	2	< 2	< 2	< 2	< 2
B/3-5	< 2	< 2	256	< 2	< 2	< 2
B/3-8	2	512	< 2	2	2	< 2

Tabelle 3: Antikörpertiter im ELISA zur Bestimmung der Globulinklassen- und subklassen der mAk aus serumfreien Zellkulturüberständen gegen Staphylokokken-Enterotoxine C₁ und B. Angegeben sind die Titer der Antiseren gegen die Globulinklassen- und subklassen im indirekten ELISA, O.D. größer 0,15.

3.2.5. Produktion von Ascites und Proteinbestimmung

Ascitesproduktion war mit allen Klonen möglich. Zwischen sieben und zehn Tagen nach dem intraperitonealen Hybridomzellinokulum konnte mit der Ascitesgewinnung begonnen werden. Bei der Mehrzahl der Mäuse wurde wiederholt, bis zu maximal fünfmal, punktiert. Das je Klon erhaltene Ascitesvolumen schwankte von 2 bis 12 ml. Nach Abzentrifugieren der Asciteszellen wurde die Antikörperaktivität im Toxin-ELISA untersucht. Enthielt die Ascitesflüssigkeit positive Antikörper, was immer der Fall war, wurde sie affinitätschromatographisch gereinigt und

der Proteingehalt bestimmt. Über die Ergebnisse informiert die Tabelle 4. Wie aus den Werten erkennbar ist, läßt der Vergleich zwischen Antikörpertiter und Proteinkonzentration der IgG₁-Antikörper (die C₁-Gruppe) keine direkte Korrelation erkennen. Dies wird durch einen Verlust der IgG₁-Antikörper bei der Protein A-Reinigung verursacht, da IgG₁-Antikörper schon bei pH 6 - 8 eluiert werden (vergl. 3.1.3.1.).

mAk	SEB	SEC ₁	Protein
B/3-4	n.u.	---	0,30
B/3-5	32768	---	5,40
B/3-8	16384	---	4,65
C ₁ /2-3	---	2048	0,88
C ₁ /4-6	---	4096	2,03
C ₁ /3-1	> 2048	4096	0,91
C ₁ /3-3	> 2048	16384	4,82
C ₁ /3-4	> 2048	16384	1,05
C ₁ /3-9	> 2048	8192	0,85
C ₁ /3-10	> 2048	16384	1,48

Tabelle 4: Nachweis des Antikörpergehaltes im Mausascites nach ELISA-Titer und Proteinkonzentration. Der ELISA-Titer ist angegeben als reziproker Wert des Endtiters (O.D. > 0,15) im indirekten ELISA auf toxinbeschichteter Platte mit BSA-Block und einer Ausgangsverdünnung von 1 : 1000 des ungereinigten Ascites. Die Proteinkonzentration ist angegeben in mg/ml nach Reinigung über die Protein A-Säule.

3.2.6. Biotinylierung der monoklonalen Antikörper

Die Biotinylierung wurde mit den mAk B/3-5, B/3-8, C₁/3-3, C₁/3-4, C₁/3-10 und C₁/4-6 durchgeführt. Die restlichen mAk wurden nicht biotinyliert, da dafür ein Proteingehalt vom 1 mg/ml erforderlich ist. Zur Überprüfung der Effektivität der Biotin-Kopplung wurden die Biotin-Konjugate anschließend im direkten ELISA (Biotin-Streptavidin-System) auf Toxin-Platten und Leerplatten eingesetzt. Eine unspezifische Bindung an die leeren Platten unter den üblichen Reaktionsbedingungen erfolgte nicht. Die Konjugate der mAk reagierten mit den Toxinen auch bei einer Ausgangsverdünnung von 1 : 400 noch sehr gut, z.T. bis über den Meßbereich des Photometers. Da es noch keine Methode zur Trennung von biotinylierten und nicht biotinylierten Antikörpern gibt, kann über die Anteile von Biotin-Konjugaten und ungekoppelten Antikörpern im Endprodukt keine Aussage gemacht werden. Eine Verdünnung von 1 : 400 bedeutet daher bei 1 mg/ml eingesetztem Antikörper 2,5 µg/ml oder weniger. Die Abbildungen 3, 4 und 5 zeigen den Kurvenverlauf der spezifischen Reaktion der Biotinkonjugate mit den Enterotoxinen SEB und SEC₁ anhand der Extinktionwerte (O.D.) und den dazugehörigen Verdünnungsstufen im direkten ELISA.

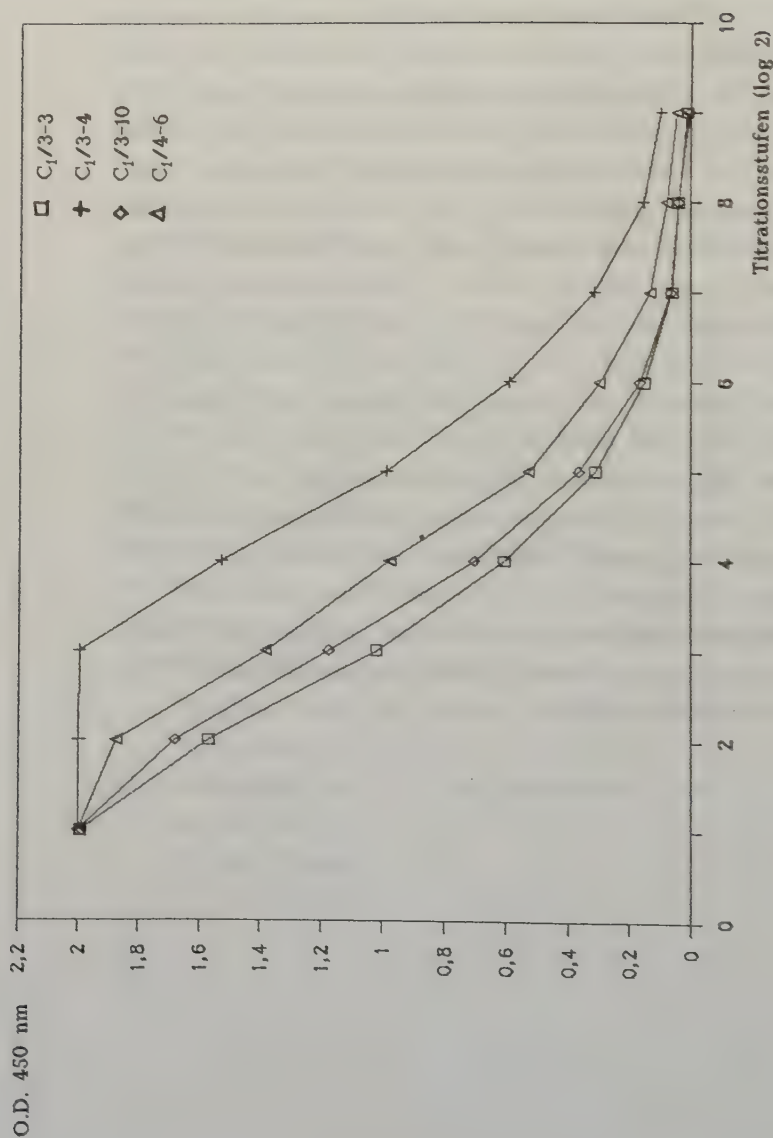


Abbildung 3: ELISA-Werte (optische Dichte bei 450 nm) der biotinylierten monoklonalen Antikörper im Biotin-Streptavidin System bezogen auf die Titrationstufen (log 2). Ausgangsverdünnung der Biotin-Konjugate war 1 : 400. Gemessen wurde die Reaktion im direkten ELISA auf einer mit SEC_1 (0,1 μ g/Vertiefung) beschichteten Platte.

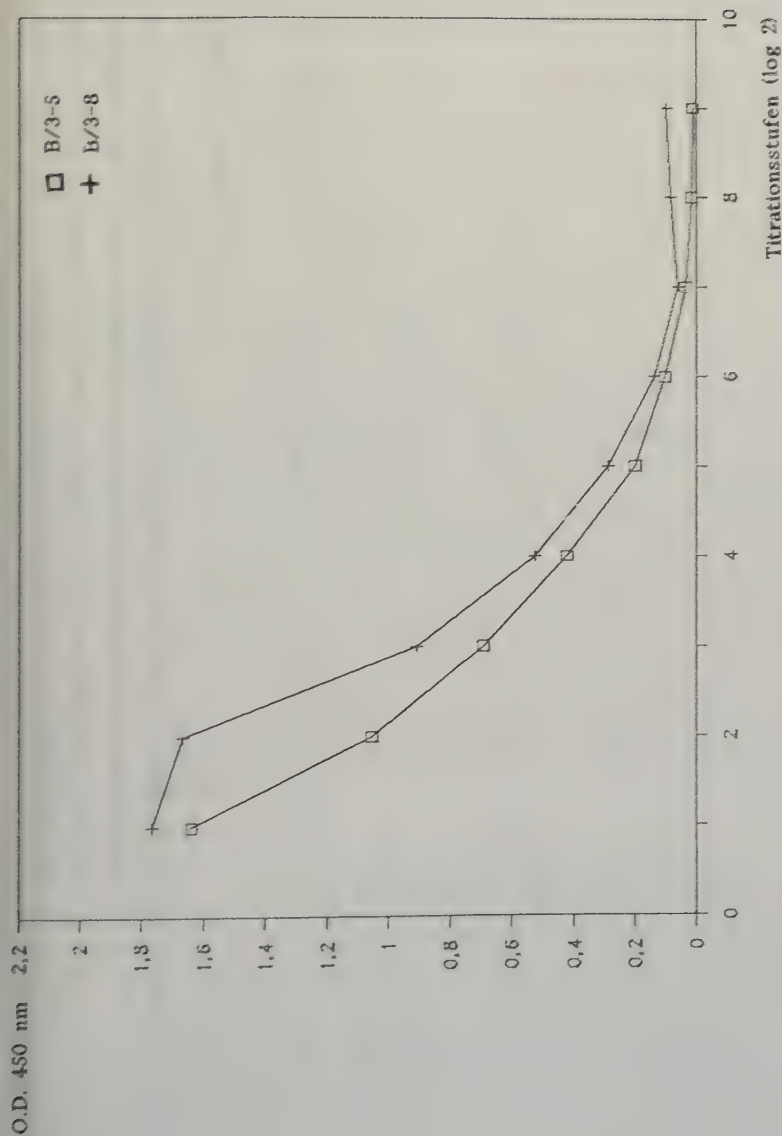


Abbildung 4: ELISA-Werte (optische Dichte bei 450 nm) der biotinylierten monoklonalen Antikörper im Biotin-Streptavidin System bezogen auf die Titrationsstufen (log 2). Ausgangsverdünnung der Biotin-Konjugate war 1 : 400. Gemessen wurde die Reaktion im direkten ELISA auf einer mit SEB (0.1 µg/Vertiefung) beschichteten Platte.

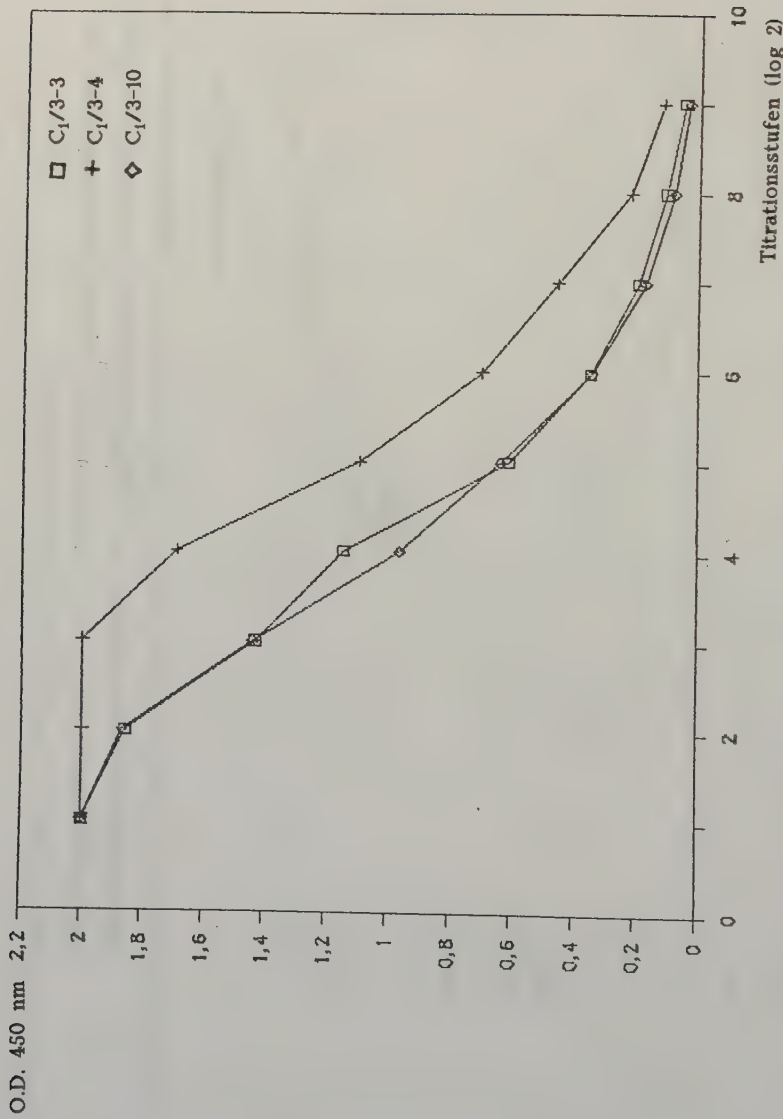


Abbildung 5: ELISA-Werte (optische Dichte bei 450 nm) der biotinylierten monoklonalen Antikörper im Biotin-Streptavidin System bezogen auf die Titrationsstufen (log 2). Ausgangsverdünnung der Biotin-Konjugate war 1 : 400. Gemessen wurde die Reaktion im direkten ELISA auf einer mit SEB (0,1 µg/Vertiefung) beschichteten Platte.

3.2.7. Vergleich der monoklonalen Antikörper im Kompetitions-ELISA

Die Kompetitions-ELISA's wurden wie unter 3.2.7. beschrieben durchgeführt. Als optimale Biotin-Konjugatverdünnungen wurden für die einzelnen mAk folgende Arbeitsverdünnungen ermittelt: Der mAk C₁/3-3 wurde als Konjugat bei 1 : 400; C₁/3-4 bei 1 : 1600; C₁/3-10 bei 1 : 600; C₁/4-6, B/3-5 und B/3-8 wurden 1 : 800 verdünnt eingesetzt.

Die Konjugate der C₁-mAk wurden auf SEC₁-Platten und die Konjugate der SEB-mAk wurden auf SEB-Platten untersucht.

Vor den Untersuchungen wurden drei Vorgruppen gebildet, von denen zu erwarten war, daß sie erstens eventuell in sich gleich sind, und zweitens mit höchster Wahrscheinlichkeit sich von den anderen Gruppen unterscheiden, da das Gruppenverhalten bezüglich der direkten Bindung an die Toxine unterschiedlich war: **Vorgruppe A:** B/3-4, B/3-5 und B/3-8 binden nur an SEB; **Vorgruppe B:** C₁/2-3 und C₁/4-6 binden nur an SEC₁; **Vorgruppe C:** C₁/3-1, C₁/3-3, C₁/3-4 und C₁/3-10 reagieren sowohl mit SEB als auch mit SEC₁. Innerhalb dieser Vorgruppen wurden alle Kombinationen getestet und Hemmeffekte zwischen Vertretern der Vorgruppen wurden nur anhand einiger ausgewählter Beispiele untersucht. Die Ergebnisse wurden in Prozent umgerechnet und graphisch dargestellt. (Abbildungen 6 - 11).

Hemm-Kombinationen, die wirkungslos waren, d.h. 0%-Hemmung und 100%-Extinktion über alle Konzentrationsbereiche des eingesetzten Hemm-Ak, wurden in den Graphiken nicht berücksichtigt.

So wurde bei der Vorgruppe **A** der mAk B/3-5 (Abb. 7) in keiner Weise von B/3-4 und B/3-8 gehemmt, die Extinktionsverminderungen durch C₁/3-1 beruhen auf unspezifischen Effekten (da nicht konzentrationsabhängig); das bedeutet, daß dieser mAk nur durch Eigenhemmung (50%-Hemmung zwischen 2,5 µg/ml und 5 µg/ml) vom Epitop verdrängt werden konnte.

Ebenso wurde B/3-8 weder von B/3-5, noch von $C_1/3-1$ und $C_1/3-10$ gehemmt, dagegen von B/3-4 in fast identischer Weise wie von sich selbst (beidemale liegt die 50%-Hemmung bei $2,5 \mu\text{g/ml}$): siehe Abb. 6. Die Vorgruppe B konnte mit drei Tests untersucht werden. Das Konjugat von $C_1/4-6$ wird gleich stark von $C_1/2-3$ und $C_1/4-6$ (Eigenhemmung und Fremdhemmung bei etwa $10 \mu\text{g/ml}$) gehemmt. Die Beeinflussung durch $C_1/3-3$ ist weder konzentrationsabhängig noch geradlinig, es kann daher angenommen werden daß, sie auf unspezifischen Zufallseffekten beruht, siehe Abb. 8.

Die Vorgruppe C stellte sich (wie Vorgruppe A) heterogen in ihrem Hemmverhalten dar (Abb. 9 -11). Den stärksten Hemmeffekt löste der mAk $C_1/3-4$ bei $C_1/3-4$ und $C_1/3-10$ aus (50%-Hemmung jeweils bei $0,15 \mu\text{g/ml}$), etwas schwächer reagierte $C_1/3-1$ in Konkurrenz zu $C_1/3-3$, $C_1/3-4$ und $C_1/3-10$ (50%-Hemmung in allen Fällen zwischen $0,61 \mu\text{g/ml}$ und $1,25 \mu\text{g/ml}$). Die höchsten Konzentrationen zur effektiven Hemmung benötigten die mAk $C_1/3-3$ und $C_1/3-10$ (50%-Hemmung jeweils zwischen $2,5 \mu\text{g/ml}$ und $5,0 \mu\text{g/ml}$). Jedoch läßt sich erkennen, daß alle mAk dieser Vorgruppe sich gegenseitig im Bindungsverhalten hemmend beeinflussen können.

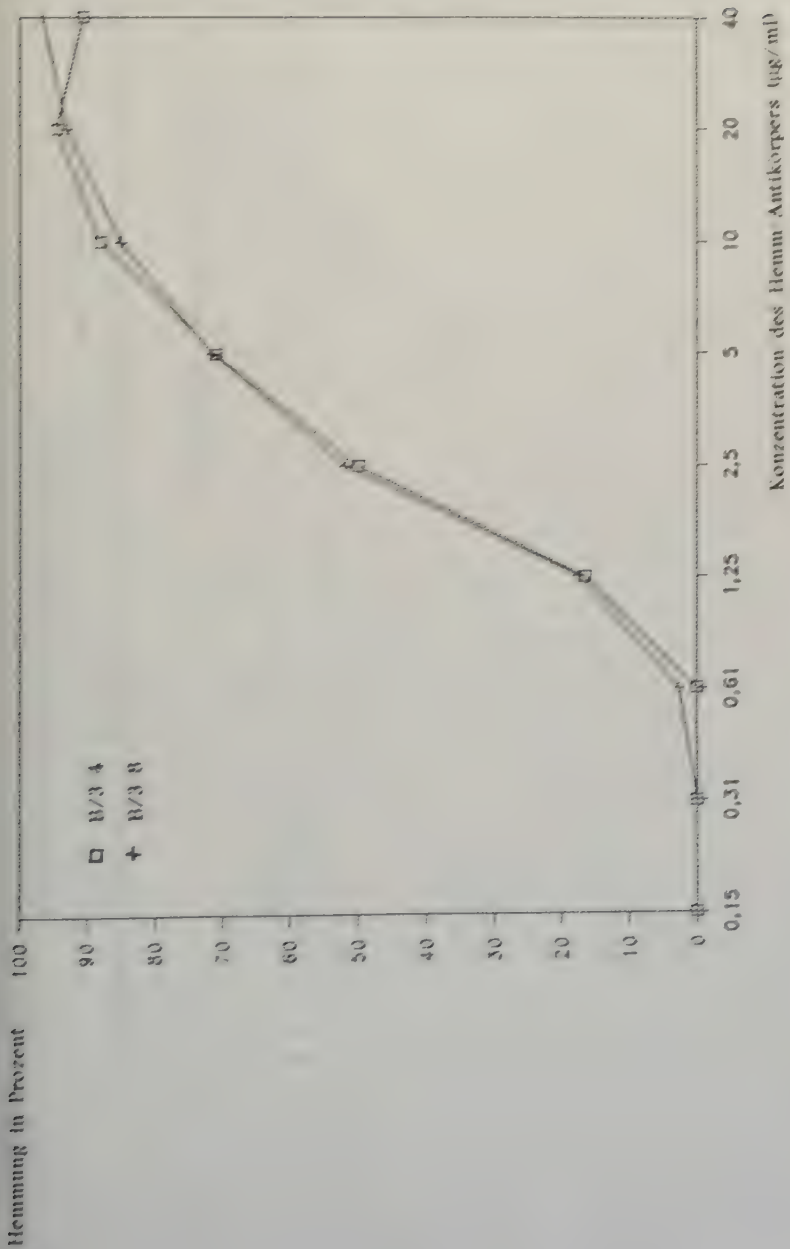


Abbildung 6: Hemmkurve zur Darstellung des Kompetitiven ELISA's der angegebenen mAk mit dem Biotin Konjugat von B/3 8 (Konjugat Verdünnung 1 : 800). Angegeben ist die Hemmung in Prozent bei den eingesetzten Mengen an mAk.

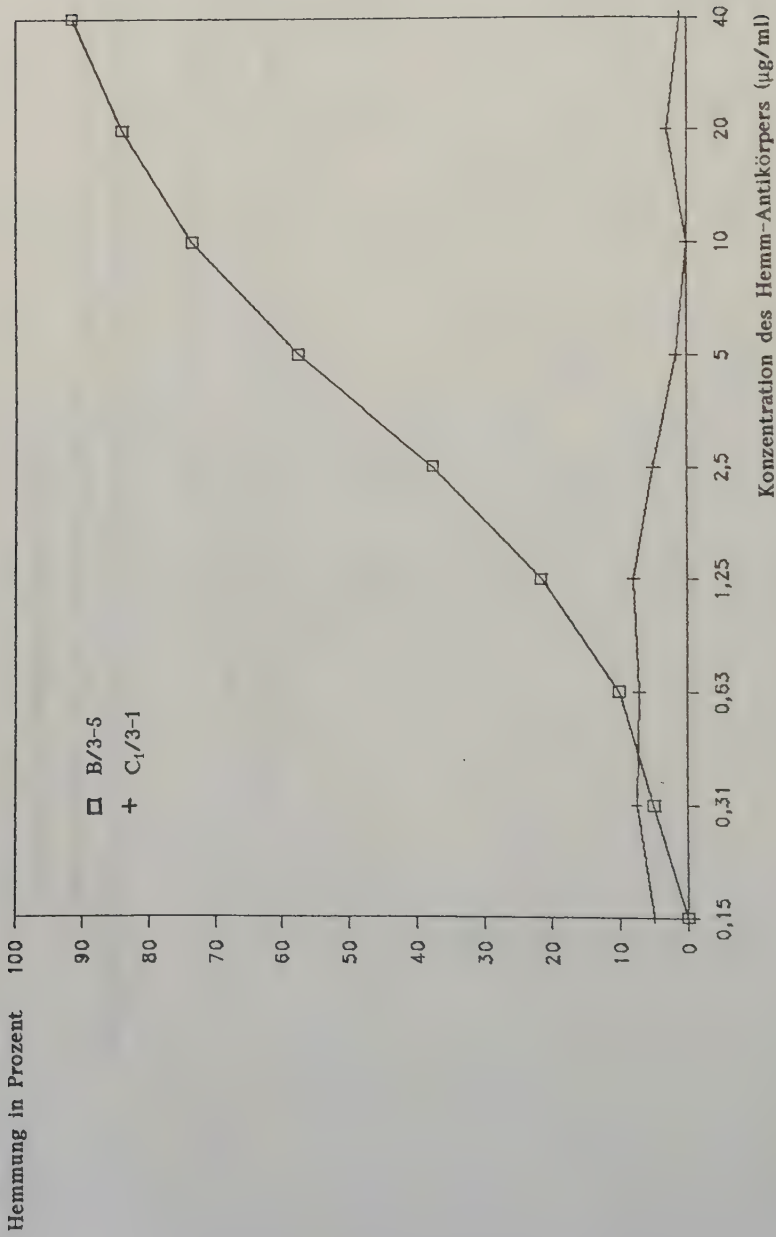


Abbildung 7: Hemmkurve zur Darstellung des Kompetitions-ELISA's der angegebenen mAk mit dem Biotin Konjugat von B/3-5 (Konjugat-Verdünnung 1 : 800). Angegeben ist die Hemmung in Prozent bei den eingesetzten Mengen an mAk.

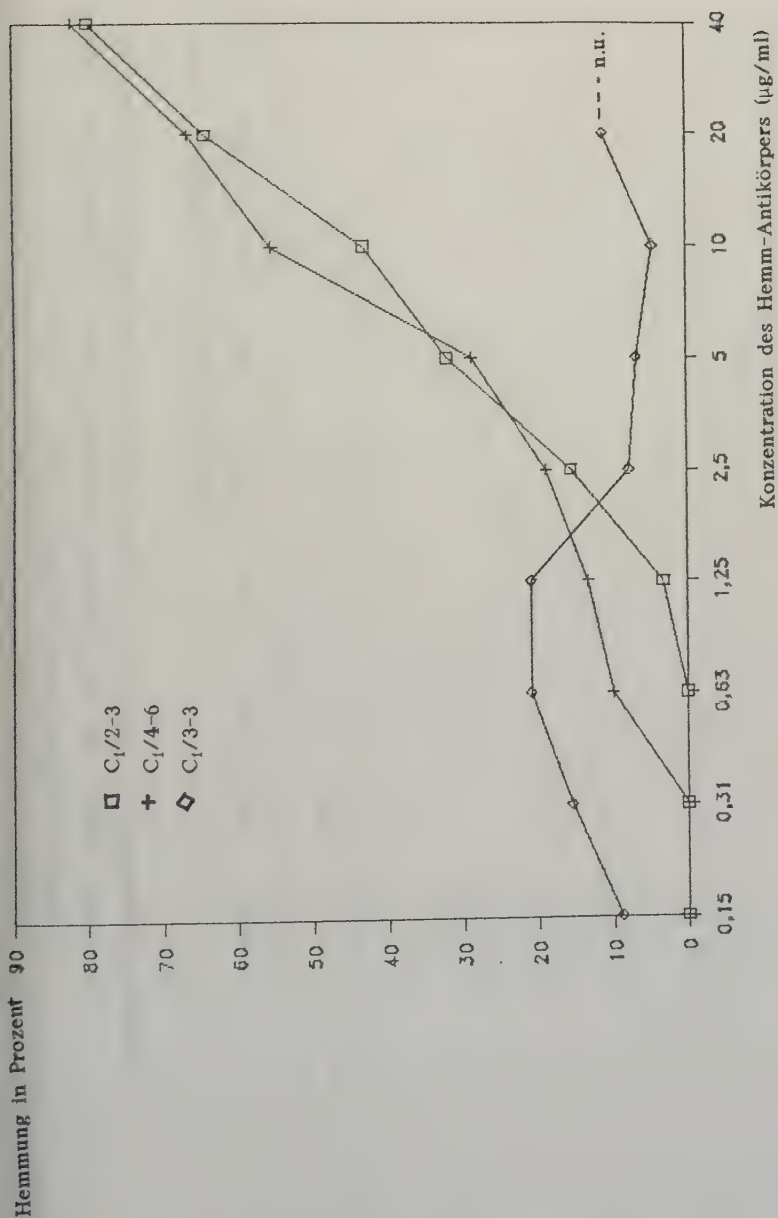


Abbildung 8: Hemmkurve zur Darstellung des Kompetitions-ELISA's der angegebenen mAk mit dem Biotin Konjugat von $C_1/4-6$ (Konjugat-Verdünnung 1 : 800). Angegeben ist die Hemmung in Prozent bei den eingesetzten Mengen an mAk.

n.u.: nicht untersucht

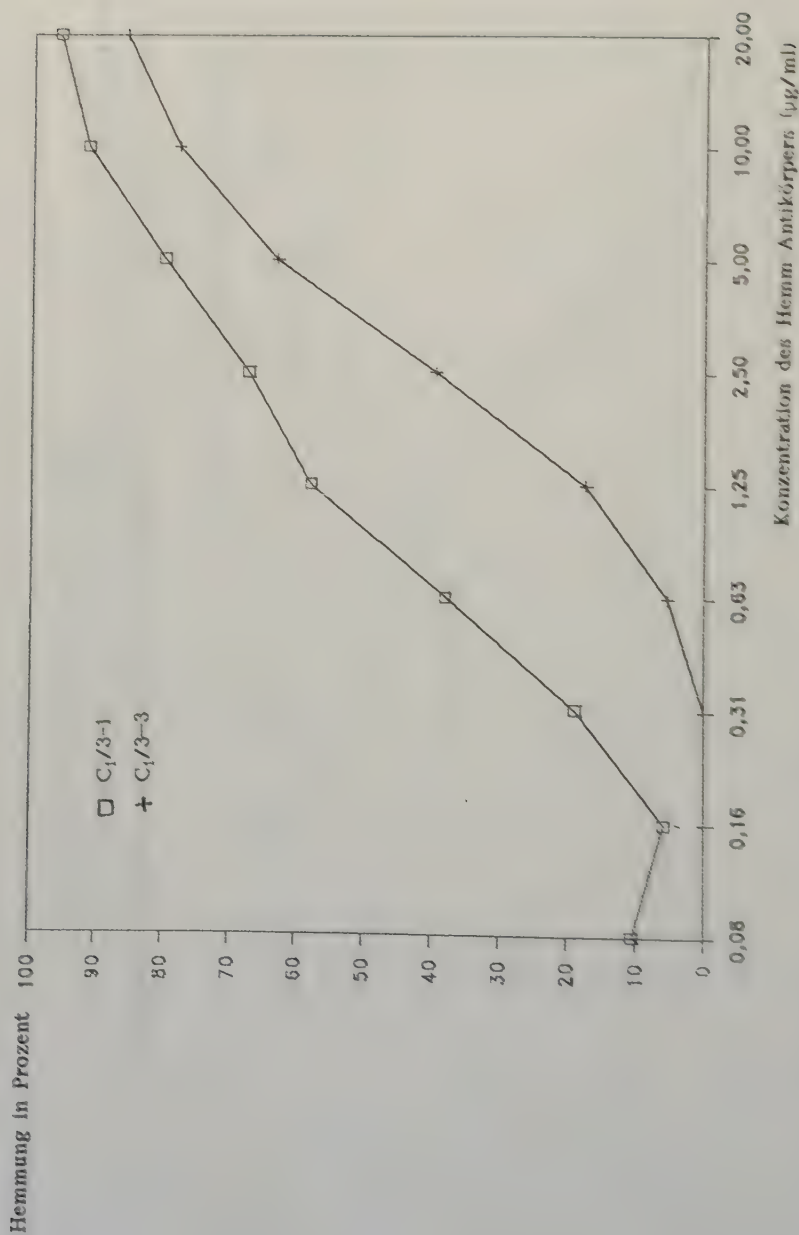


Abbildung 9: Hemmkurve zur Darstellung des Kompetitions-ELISA's der angegebenen mAk mit dem

Biotin Konjugat von $C_1/3-3$ (Konjugat-Verdünnung 1 : 400). Angegeben ist die Hemmung in

Prozent bei den eingesetzten Mengen an mAk.

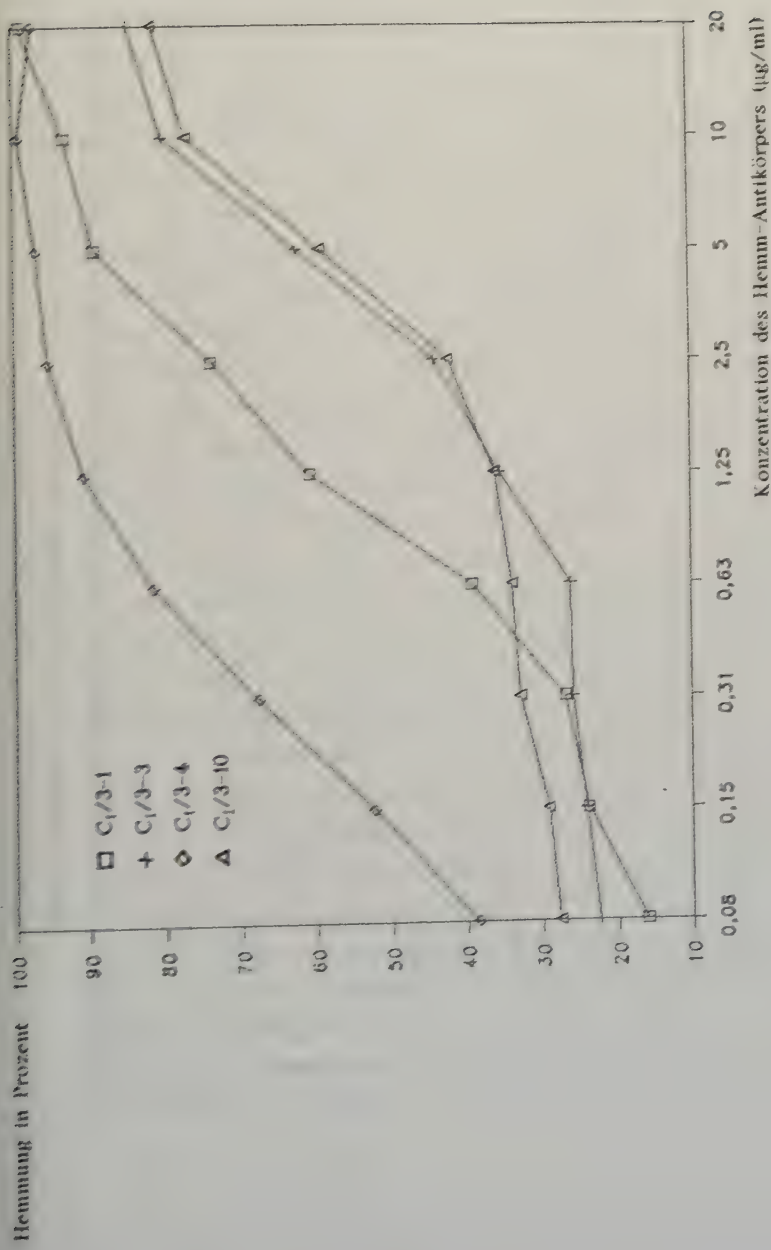


Abbildung 10: Hemmkurve zur Darstellung des Kompetitions-ELISA's der angegebenen mAk mit dem Biotin Konjugat von $C_1/3-4$ (Konjugat-Verdünnung 1 : 1600). Angegeben ist die Hemmung in Prozent bei den eingesetzten Mengen an mAk.

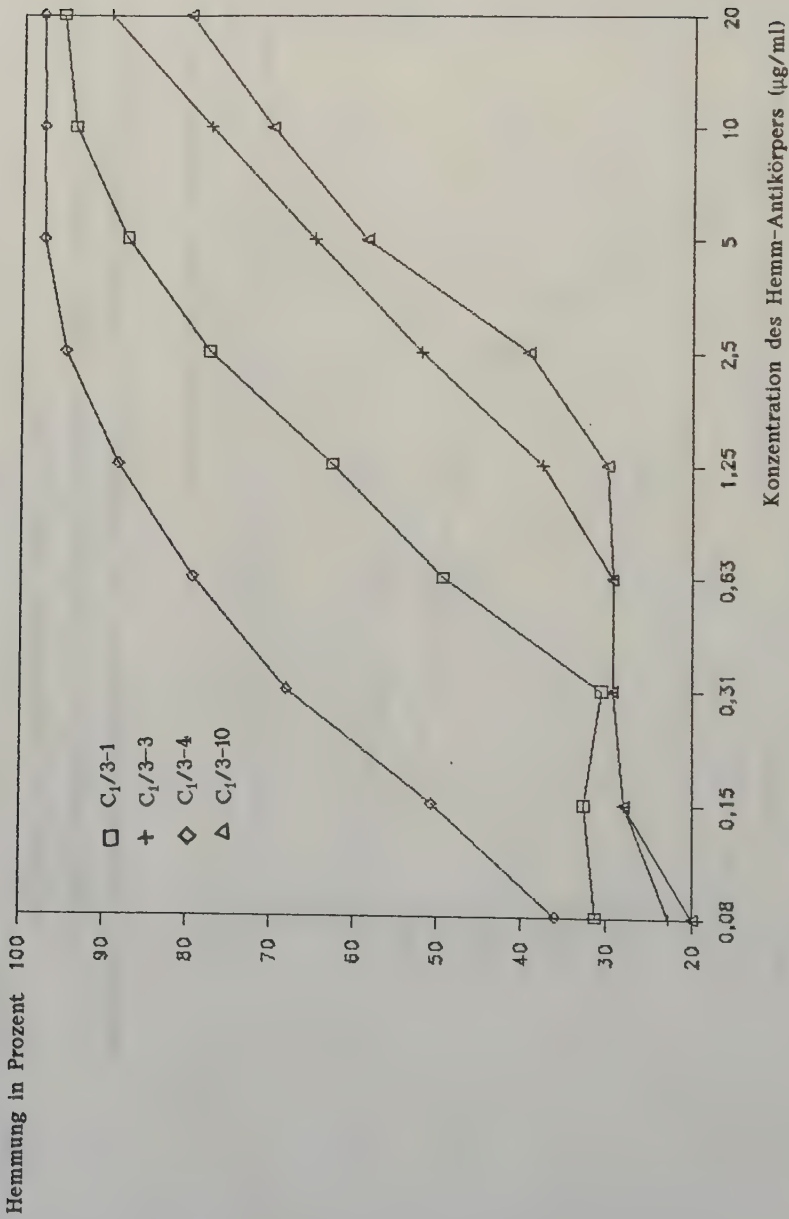


Abbildung 11: Hemmkurve zur Darstellung des Kompetitions-ELISA's der angegebenen mAk mit dem Biotin Konjugat von $C_1/3-10$ (Konjugat-Verdünnung 1 : 600). Angegeben ist die Hemmung in Prozent bei den eingesetzten Mengen an mAk.

4. Besprechung der Ergebnisse

Gegen die Antigene Staphylokokkenenterotoxin B und C₁ wurden insgesamt zehn antikörperproduzierende, monoklonale Hybridomzelllinien etabliert. Aus der in sieben Fusionen produzierten Vielzahl an monoklonalen Antikörpern wurde frühzeitig nach günstigen Wachstumseigenschaften, guter Antikörperproduktion, hoher Spezifität und möglicher Variabilität unter den monoklonalen Antikörper selektiert. Daher mußte der Großteil der monoklonalen Antikörpern verworfen oder fusionsreife Milzzellen und Elternzelllinien (noch nicht kloniert) gefrierkonserviert werden. Andererseits wären Kapazität des Brutschrankes und der Testsysteme, sowie die Arbeitskraft eines Experimentators überschritten worden. Als Alternative hätten die Zellen auch unmittelbar nach der Fusion eingefroren werden können (Peters et al., 1985), um sie dann zeitversetzt zu bearbeiten, was aber im Wesentlichen keinen Unterschied macht.

Die zehn selektierten Klone (B/3-4, B/3-5, B/3-8, C₁/3-1, C₁/3-3, C₁/3-4, C₁/3-9, C₁/3-10 und C₁/4-6) wurden alle dem IgG-Isotyp zugeordnet, die C₁-monoklonalen Antikörper ausschließlich zu IgG₁, B/3-4 ist ebenso ein IgG₁-Antikörper; B/3-5 gehört zur IgG_{2b}- und B/3-8 zur IgG_{2a}-Subklasse. Die IgG-Antikörper sind die ausschließlichen Toxin-Antikörper (Roitt et al., 1987), wie auch die von anderen Untersuchern festgelegten Subklassen der polyklonalen (Józefczyk, 1974) und monoklonalen Anti-SE-Antikörper (Meyer et al., 1984; Thompson et al., 1984, 1985, 1986; Edwin et al., 1986b).

Die Toxinspezifität wurde im indirekten ELISA getestet und laufend überprüft. Besonderes Augenmerk wurde auf den Ausschluß sogenannter "sticky antibodies" (hohe Affinität mit nicht nachweisbarer Spezifität; Hübert, 1985) gelegt, indem unspezifische Bindungen an die leeren ELISA-Platten und niedriger Titer mit steilem Abfall von starken zu

schwachen Extinktionen zum Verwerfen des monoklonalen Antikörpers führte. Die Empfindlichkeit des nach Meyer et al. (1984) und Thompson et al. (1985) vereinfachten ELISA's kann als vollkommen ausreichend bezeichnet werden, da die ermittelten Serum-Titer der Mäuse schon nach der Grundimmunisierung mit 1 : 204 800 bis 1 : 3 276 800 das 5 bis 80-fache des geforderten Titers von 1 : 40 000 für Antigene kleiner als 50 000 Dalton erreichten (Peters et al., 1985). Die hohen Titer stehen auch im Zusammenhang mit der Anwendung von Adjuvantien (Freund'sches komplettes und inkomplettes Adjuvans) und der bekannt guten Antigenität von SEB und SEC₁ (Józefczyk et al., 1980).

Kreuzreaktionen der monoklonalen Antikörper gab es nur für SEB und SEC₁. Bindungen an gereinigtes SEA, SED und SEE fanden nicht statt. Dies entspricht der serologischen Gruppeneinteilung der Toxine von Lee et al. (1978, 1980).

Hervorzuheben ist, daß die monoklonalen Antikörper C₁/2-3 und C₁/4-6 als Anti-SEC₁-Antikörper nicht mit SEC₂ und SEC₃ reagieren, obwohl diese drei Enterotoxin Typen serologisch sehr eng verwandt sind (Reiser et al., 1984). Da Thompson et al. (1984, 1985, 1986) für ihre Fusionszwecke i.d.R. die Mäuse mit SEC₂ oder SEC₃ immunisierten, kreuzreagieren diese mAk mit allen drei SEC-Typen. Der einzige von dieser Forschergruppe gegen SEC₁ entwickelte mAk kreuzreagiert mit SEB. Mit den mAk C₁/2-3 und C₁/4-6 ist es somit erstmalig gelungen, monoklonale Antikörper zu produzieren, die ausschließlich mit SEC₁ reagieren. Die Anwesenheit dieser ausschließlich SEC₁-spezifischen Antikörper in polyklonalen Anti-SEC₁-Seren führt im Doppel-Gel-Diffusionstest zu der bekannten Spornbildung (Reiser et al., 1984).

Alle monoklonale Antikörper, außer C₁/3-9, wurden im Kompetitions-ELISA auf gegenseitige Beeinflussung in der Epitopenbesetzung untersucht. Danach mußten aus drei Vorgruppen vier Gruppen mit absolut unterschiedlichen Antikörpern gebildet werden. In **Gruppe 1**, bestehend aus

B/3-4 und B/3-8, befinden sich zwei identische monoklonale Antikörper, die trotz verschiedenen Isotyps mit gleicher Affinität das gleiche Epitop binden, das nur auf SEB vorkommt. **Gruppe 2** wird nur durch B/3-5 vertreten. Auch er bindet nur an SEB, läßt sich von Gruppe 1 dabei in keiner Weise beeinflussen, auch nicht von C₁/3-1 und C₁/3-10, Vertretern der Gruppe 4. Die Verschiedenheit von B/3-5 zur **Gruppe 3**, C₁/2-3 und C₁/4-6, ist klar, da diese exklusiv an SEC₁ binden. Sie hemmen sich gegenseitig völlig in fast parallelem Kurvenverlauf. Die Hemmung zwischen 10% und 20% durch C₁/3-3 ist für eine signifikante Aussage zu gering und unabhängig von der Konzentration. Daher beruht diese Beobachtung auf unspezifischen, sterischen Effekten. Die **Gruppe 4**, C₁/3-1, C₁/3-3, C₁/3-4 und C₁/3-10, erkennt einheitlich SEB und SEC₁ und hemmt sich gegenseitig in der Antigen-Antikörperreaktion, jedoch in unterschiedlichen Stärken. C₁/3-4 zeigt die höchste Verdrängungskraft und damit Affinität zum vermutlich gemeinsamen Epitop. C₁/3-1 besitzt mittlere Hemmstärke und C₁/3-3 sowie C₁/3-10 sind die monoklonalen Antikörper mit der geringsten Affinität. Diese vier monoklonale Antikörper, die alle aus der gleichen Fusion stammen, erkennen vermutlich das gleiche Epitop oder "überlappende Epitope" mit verschiedener Spezifität (Paßgenauigkeit) und /oder Affinität, wobei diese beiden Eigenschaften wie bei polyvalenten Antikörpern in inverser Beziehung stehen (Tizard, 1981).

Die produzierten monoklonalen Antikörper eignen sich sehr gut für Molekül-Topographie-Studien an den Toxinen. Binden z.B. B/3-5 und B/3-4 bzw. B/3-8 an die beiden antigenetisch verschiedenen, durch Trypsin-verdauung entstandenen Fragmente von SEB (Spero et al., 1979) ? Wenn ja, dann sicher nicht an die auf diesen Fragmenten sitzenden "Hauptdeterminanten", denn diese wiederum werden auch von Anti-SEC₁-Serum erkannt, d.h. diese Epitope sind ebenso auf SEC₁ oder besitzen dort engverwandte Epitope; dann müßten B/3-5, B/3-4 und B/3-8 auch an SEC₁ binden,

was nicht der Fall ist. Es wurden bisher Berichte über zwei monoklonale Antikörper veröffentlicht, die im Western-Blot nur an ein SEB-17 000 Trypsinfragment und nicht an SEC₁ binden, dabei soll dieses SEB-17 000 dem SEB-17 000 von Spero et al. (1979) entsprechen (Thompson et al., 1984). Diese beiden monoklonale Antikörper können aber identisch sein, da entsprechende Untersuchungen noch ausstehen.

Somit wären B/3-5 und B/3-4 bzw. B/3-8 neue monoklonale Antikörper, die auf SEB bisher unbekannte Determinanten erfassen, deren spezifische Antikörper im polyvalenten Antiserum in der Fülle der Antikörper gegen andere, wirksamere Determinanten quasi untergehen (Burger, 1985). Die beiden monoklonalen Antikörper 337.3.3. und 332.1.2. (Notermans et al., 1987), die in ähnlicher Weise mit SEB und nicht mit SEC₁ reagieren, wurden aber anders selektiert, nämlich auf Neutralisation von SEB in Affen. B/3-5 und B/3-4 bzw. B/3-8 sollten deshalb im Neutralisationstest, SDS-PAGE und Western-Blot von nativem und trypsiniertem SEB weiteruntersucht werden.

C₁/2-3 und C₁/4-6 aus der Gruppe 3 sind bislang die einzigen monoklonalen Antikörper, die gegen SEC₁ entwickelt wurden und weder an SEC₂ bzw. SEC₃ noch an SEB binden. Sie erkennen im Kompetitions-ELISA das gleiche Epitop, das nur auf SEC₁ vorhanden ist. Diese beiden monoklonalen Antikörper könnten sich daher, ebenso wie die beiden oben genannten monoklonalen Antikörper, bestens zur Toxinreinigung oder zu Molekular-Topographie-Studien eignen. Die Toxinreinigung könnte im Sinne einer Immunoabsorption affinitätschromatographisch über Kopplung der monoklonalen Antikörper an Cyanobromid (CNBr)-aktivierte Sepharose 4B (Anonym, 1979) erfolgen.

Die monoklonalen Antikörper der Gruppe 4 (C₁/3-1, C₁/3-3, C₁/3-4 und C₁/3-10) reagieren im gewohnten Muster mit SEB und SEC₁, und bieten sich daher im Pool mit anderen monoklonalen Antikörper zum Einsatz in einem Diagnostik-ELISA an (Thompson et al., 1986).

5. Zusammenfassung

Milzzellen von mit Staphylokokken-Enterotoxinen B (SEB) und C₁ (SEC₁) getrennt immunisierten Balb/c Mäusen wurden mit Mäusemyelomzellen der Linie X63 - Ag8.653 erfolgreich fusioniert. Drei der zehn etablierten Klone reagierten im indirekten ELISA ausschließlich mit SEB, zwei Klone nur mit SEC₁ und fünf sowohl mit SEB als auch mit SEC₁. Kreuzreaktionen mit den Staphylokokken-Enterotoxinen SEA, SEC₂, SEC₃, SED und SEE wurden im ELISA nicht beobachtet.

Die Isotypen der mAk wurden mit einem indirekten Subklassen-ELISA bestimmt. Die sieben mit SEC₁ reagierenden Antikörper und ein mit SEB reagierender Antikörper gehören zur IgG₁-Subklasse. Die Subklassen IgG_{2a} und IgG_{2b} sind je einmal vertreten.

Neun der zehn mAk wurden in Kompetitions-ELISA's auf die zwei Charakteristika Affinität und Epitoperkennung verglichen. Dabei bildeten sich vier absolut verschiedene Gruppen der Klone heraus. Gruppe 1, bestehend aus den mAk B/3-4 und B/3-8 erkennen in identischer Weise nur SEB, sind aber verschiedene Isotypen. Gruppe 2 (B/3-5) erkennt ebenfalls nur SEB. Gruppe 1 und 2 hemmen sich aber gegenseitig nicht und besitzen daher verschiedene Paratope. Gruppe 3 (C₁/2-3 und C₁/4-6) reagiert selektiv mit SEC₁ und zeigt, wie zu erwarten war, keine Hemmwirkung durch oder auf die anderen drei Gruppen. Die mAk der Gruppe 4 (C₁/3-1, C₁/3-3, C₁/3-4 und C₁/3-10) erkennen ein gleiches oder auch nur ähnliches beziehungsweise überlappendes Epitop auf SEB und SEC₁ mit verschiedenen Affinitäten.

6. Summary

PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF MONOCLONAL ANTIBODIES TO STAPHYLOCOCCAL ENTEROTOXINS B AND C₁

Spleen cells from Balb/c mice immunized either with staphylococcal enterotoxin (SE) SEB or SEC₁ were successfully fused with X63-Ag8.653 mouse myeloma cells. In the indirect ELISA three of the ten established clones reacted exclusively with SEB, two clones solely with SEC₁ and five ones as well with SEB as with SEC₁. Cross-reactivity of the monoclonal antibodies (Mab) with SEA, SEC₂, SEC₃, SED and SEE in the ELISA-system have not been observed.

Antibody subclasses were determined with the help of an indirect anti-subclass-ELISA. The seven with SEC₁ reacting MAB's and one MAB reacting with SEB belong to the IgG₁-subclass. IgG_{2a} and IgG_{2b} are represented each once.

Nine of the ten MAB's were compared in Competition-ELISA's with regard to affinity and epitope recognition. Therefore four absolut different groups were developed. Group 1, consisting of MAB B/3-4 and B/3-8, recognize in identical manner SEB, but they belong to different subclasses. Group 2 (B/3-5) recognizes also only SEB. Yet group 1 and 2 don't compete with each other in the Competition-ELISA and therefore own different paratopes. Group 3 (C₁/2-3 and C₁/4-6) react selectively with SEC₁ and exhibits, as it was expected, no inhibition by or on the other three groups. The MAB's of the group 4 (C₁/3-1, C₁/3-3, C₁/3-4 and C₁/3-10) are reacting with a coincident or only a similar respectively an overlapping epitope on SEB and SEC₁ with different affinities.

6. Literaturverzeichnis

Anonym, (1979):

Affinity Chromatography - Principles & Methods
Handbuch der Fa. Pharmacia, Uppsala, Schweden

Archer, D.L., Wess J.A. und Johnson H.M. (1981):

Inverse relationship between immune interferon induction and
mitogen effects on the maturation of the primary antibody
response
Immunopharmacology 3, 71-81

Archer, D.L., Smith B.G., Ulrich J.T. und Johnson H.M. (1979):

Immune interferon induktion by T-cell mitogens involves
different T-cell subpopulations
Cell. Immunol. 48, 420-426

Archer, D.L., Wess J.A., Kaylor L.O., Cox S. und Murthy G.K. (1978):

Induction of early maturation of the thymus-dependent,
primary in vitro antibody response by staphylococcal
enterotoxin D
Abstr. Ann. Meet. Am. Soc. Microbiol., p.26

Bamberger, U., Scheuber P.H., Sailer-Kramer B., Bartsch K., Hartmann A.,
Beck G. und Hammer D.K. (1986):

Anti-idiotypic antibodies that inhibit immediate-type skin
reactions in unsensitized monkeys upon challenge with
staphylococcal enterotoxin
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 7054-7058

Bergdoll, M.S. (1966):

Immunization of rhesus monkeys with enterotoxoid B
J. Infect. Dis. 116, 191-196

Bergdoll, M.S. (1970):

Enterotoxins
in: Montie T.C., Kadis S. und Ajl S.J.:
Microbial Toxins
Academic Press, New York, London

Bergdoll, M.S. (1977):

Immunological aspects of staphylococcal enterotoxins
in: Catsimpooolas N.:
Immunological aspects of foods
The AVI Publishing Company, Westport

Bergdoll, M.S. (1983):

Enterotoxins
in: Easman C.S.F. und Adlam G.:
Staphylococci and staphylococcal infections, 2, 559-598
Academic Press Inc., London

Bergdoll, M.S., Surgalla M.J. und Dack G.M. (1959):

Staphylococcal enterotoxin: Identification of a specific
precipitating antibody with enterotoxinneutralizing property
J. Immunol. 83, 334-338

Burger, R. (1985):

Die Anwendung monoklonaler Antikörper in der Mikrobiologie-
Möglichkeiten und Grenzen
Forum Mikrobiol. 8, 22-32

Buxser, E.S., Bonventre P.F. und Archer D.L. (1983):

Staphylococcal enterotoxin induced mitogenesis: toxin binding
and cell-cell interactions
Microbiologica, 6, 181-190

Casman, E.P., Bergdoll M.S. und Robinson J. (1963):

Designation of staphylococcal enterotoxins
J. Bact. 85, 715-716

Chalet, L. und Wolf F.J. ((1964):

The properties of streptavidin, a biotin-binding protein
produced by streptomycetes
Arch. Biochem. Biophys. 106, 1-5

Costello, S.M., Felix R.T. und Giese R.W. (1979):

Enhancement of immune cellular agglutination by use of
an avidin-biotin system
Cli. Chem. 25, 1572-1580

- Czerny, C.-P. (1986):
Zellkulturadaptierung des Humanen Coronavirus OC-43
und dessen epizootiologische Bedeutung
Diss. med. vet. München
- Chen, S.E., Tse C.S., Bernstein J.L. und Archer D. (1980):
In vivo suppression and enhancement of the murine homocytotrophic antibody response by staphylococcal enterotoxin A
Int. Archs. Allergy appl. Immun. 63, 470-472
- Crawley, G.J., Gray J., Leblang W.A. und Blanchard J.W. (1969):
Blood binding, distribution and excretion of staphylococcal enterotoxin in monkeys
J. Infect. Dis. 116, 48-56
- Donelly, C.B., Leslie J.E., Black L.A. und Lewis K.H. (1967):
Serological identification of enterotoxigenic staphylococci from cheese
Appl. Microbiol. 15, 1382-1387
- Edwin, C., Tatini S.R. und Maheswaran S.K. (1986a):
Specificity and cross-reactivity of staphylococcal enterotoxin A monoclonal antibodies with enterotoxins B, C₁, D und E
Appl. Environ. Microbiol. 52, 1253- 1257
- Edwin, C., Tatini S.R. und Maheswaran S.K. (1986b):
Nature and reactivity of staphylococcal enterotoxin A monoclonal antibodies
Appl. Environ. Microbiol. 52, 1247-1252
- Edwin, C., Tatini S.R., Strobel R.S. und Maheswaran S.K. (1984):
Production of monoclonal antibodies to staphylococcal enterotoxin A
- Ende, I.A., Terplan G., Kickhöven B. und Hammer D.K. (1983):
Chromatofocusing: a new method for purification of staphylococcal enterotoxins B and C₁
Appl. Environ. Microbiol. 46, 1323-1330

- Ey, P.L., Prowse S.J. und Jenkin C.R. (1978):
Isolation of pure IgG₁, IgG_{2a} and IgG_{2b} immunoglobulins
from mouse serum using protein A-sepharose
Immunochem. 15, 429-436
- Fazekas de St. Groth und Scheidegger D. (1980):
Production of monoclonal antibodies: Strategy and tactics
J. Immunol. Meth. 35, 1-25
- Felsenfeld, O. und Nasuniya N. (1964):
Staphylococcal antitoxin values in the sera of permanent
residents and visitors in Thailand
J. Trop. Med. Hyg. 67, 300-303
- Fey, H., Pfister H. und Rügge O. (1984):
Comparative evaluation of different ELISA systems for the
dedection of staphylococcal enterotoxins A, B, C and D.
J. Clin. Microbiol. 19, 34-38
- Friedmann, R.M. und Vogel S.N. (1983):
Interferons with special emphasis on the immune system
Adv. Immunol. 34, 97-140
- Forsgen, A. und Sjoquist J. (1966):
"Protein A" from *S. aureus*. I. Pseudo-immune reaction with
human gamma-globulin
J. Immunol. 97, 822-827
- Görg, A., Postel W. und Westermeier R. (1982):
SDS electrophoresis of legume seed protein in horizontal
ultrathin-layer pore gradient gels
Z. Lebensm. Unters. Forsch. 174, 282-285
- Görg, A., Postel W., Westermeier R., Righetti P.G. und Ek K. (1981):
One and two dimensional electrophoresis performed horizontally
in ultrathin SDS pore-gradients gels
LKB Application Note 320; Bromma, Schweden

- Guesdon, J.L., Ternynck T. et Avrameas S. (1979):
The use of avidin-biotin interaction in immunoenzymatic techniques
J. Histochem. Cytochem. 27, 1131-1139
- Hahn, G. (1983):
Tierexperimentelle Untersuchungen zur passiven oralen
Immunisierung gegen Staphylokokken-Enterotoxin B (SEB)
Zbl. Bakt. Hyg. A 256, 138-145
- Hahn, G. (1986):
Tierexperimentelle Untersuchungen an Primaten
(Mac. Fascicularis) zur passiven oralen Immunisierung gegen
Staphylokokken-Enterotoxin B (SEB)
Arch. L. 37, 90-94
- Hartung, S. (1986):
Zur Produktion und Reinigung von Staphylokokken-
Enterotoxin D
Vet. Med. Diss. München
- Huang, I.-X. und Bergdoll M.S. (1970)
The primary structure of staphylococcal enterotoxin B. III.
The cyanogen bromide peptides of reduced and aminoethylated
enterotoxin B, and the complete amino acid sequence
J. Biol. Chem. 245, 3518-3525
- Hübner, P. (1985):
Charakterisierung von monoklonalen Antikörpern gegen Rotaviren
und ihre Anwendung in der Diagnostik
Diss. vet. med. München
- Irvin, W.S. und Sherry R.G. (1970):
The in vitro inhibition of guinea pig macrophage migration by
staphylococcal enterotoxin B (SEB)
Clin. Res. 18, 426
- Johnson, H.M. (1977):
Cyclic AMP regulation of mitogen-induced interferon
production and mitogen suppression of immune response
Nature 265, 154-155

Johnson, H.M. und Baron S. (1976):

The nature of the suppressive effect of interferon and
and interferon inducers on the in vitro immune response
Cel. Immunol. 25, 106-115

Johnson, H.M. und Bukovic J.A. (1975):

Staphylococcal enterotoxin A inhibition of the primary in vitro
antibody response to a thymus-independent antigen.
IRCS Med. Sci. 3, 398.

Johnson, H.M., Blalock J.E. und Baron S. (1977a):

Separation of mitogen-induced suppressor and helper cell
activities during inhibition of interferon production by
cyclic AMP.
Cell. Immunol. 33, 170-179.

Johnson, H.M., Stanton G.J. und Baron S. (1977b):

Relative ability of mitogens to stimulate production of
interferon by lymphoid cells and to induce suppression of the
in vitro immune response
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 154, 138-141

Józefczyk, Z. (1974):

Specific human antibodies to enterotoxin A, B and C₁ of
staphylococcus: their increased synthesis in staphylococcal
infection
J. Infect. Dis. 130, 1-3

Józefczyk, Z., Robbins R.N., Spitz J.M. und Bergdoll M.S. (1980):

Antibodies to staphylococcal enterotoxin in laboratory personnel
J. Clin. Microbiol. 11, 438-439

Jung, R. (1988):

Staphylokokken- Enterotoxin E - Nachweis mittels ELISA sowie
Reinigung mit Hilfe affinitätsgeinigter Antikörper
Diss. med. vet. München

Kaplan, J. (1972):

Staphylococcal enterotoxin B induced release of macrophage
migration inhibition factor from normal lymphocytes
Cell. Immunol. 3, 245-252

- Kearny, J.F., Radbruch A., Liesegang B. und Rojewsky K. (1979):
A new mouse myeloma cell line which has lost
immunoglobulin expression but permits the construction
of antibody secreting cell lines
J. Immunol. 123, 1548-1550
- Köhler, G. und Milstein C. (1975):
Continuous culture of fused cells secreting antibody of
predefined specificity
Nature 256, 495-497
- Langford, M.P., Stanton G.J. und Johnson H.M. (1978):
Biological effects of staphylococcal enterotoxin A on human
peripheral lymphocytes
Infect. Immunol. 22, 62-68
- Langford, M.P., Weigent D.A., Georgiades J.A., Johnson H.M. und
Stanton G.J. (1981):
Antibody to staphylococcal enterotoxin A-induced human
immune interferon (IFN γ)
J. Immunol. 126, 1620-1623
- Langone, J.J. (1982):
Protein A of staphylococcus aureus and related
immunoglobulin receptors produced by streptococci and
pneumococci
Adv. Immunol. 32, 157-252
- Lee, A., Robbins R.N. und Bergdoll M.S. (1978):
Isolation of specific and common antibodies to staphylococcal
enterotoxins A and E by affinity chromatography
Infect. Immun. 21, 387-391
- Lee, A., Robbins R.N., Reiser R.F. und Bergdoll M.S. (1980):
Isolation of specific and common antibodies to staphylococcal
enterotoxins B, C₁ and C₂
Infect. Immun. 27, 431-434
- Lowry, O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. und Randall R.J. (1951):
Protein measurement with the folin phenol reagent
J. Biol. 193, 401-407

- Meyer, G., Rhode G. und Korte R. (1978):
Immunitätsentwicklung nach Verabreichung von Staphylokokken-
enterotoxin B bei Rhesusaffen (*Macaca mulatta*)
Wehrmed. Mschr. 22, 7-9
- Meyer, R.F., Miller L., Bennett R.W. und Macmillan J.D. (1984):
Development of a monoclonal antibody capable of interacting
with five serotypes of staphylococcus aureus enterotoxin
Appl. Environ. Microbiol. 47, 283-287
- Miller, B.A., Reiser R.F. und Bergdoll M.S. (1978):
Detection of staphylococcal enterotoxins A, B, C, D and E in
foods by radioimmunoassay, using staphylococcal cells
containing protein A as immunosorbent
Appl. Environ. Microbiol. 36, 421-426
- Notermans, S., Boot R. und Tatini S.R. (1987):
Selection of monoclonal antibodies for detection of
staphylococcal enterotoxins in heat processed foods
Int. J. Food Microbiol. 5, 49-55
- Otani T., Katami K. und Osada Y. (1985):
Stimulation by staphylococcal enterotoxin A of nonspecific
resistance of mice to microbial infection
Inf. Imm. 47, 767-773
- Peavy, D.L., Adler W.H. und Smith R.T. (1970):
The mitogenic effects of endotoxin and staphylococcal
enterotoxin B on mouse spleen cells and human peripheral
lymphocytes
J. Immunol. 105, 1453- 1458
- Pepys, M.B. und Baltz M.L. (1984):
Acute phase proteins with special reference to c-reactive
protein and related proteins (pentaxins) and serum amyloid A
protein
Adv. Immunol. 34, 141-212
- Peters, J.H., Baumgarten H. und Schulze M. (1985):
Monoklonale Antikörper
Springer Verlag, Berlin, Heidelberg

- Platsoucas, C.D., Oleszak E.L. und Good R.A. (1986):
Immunomodulation of human leukocytes by staphylococcal enterotoxin A: Augmentation of natural killer cells and induction of suppressor cells
Cell. Immunol. 97, 371-385
- Raff, M.C. und Cantor H. (1971)
in: Amos, B. (1971): Progress in Immunology
Academic Press, New York, p. 83
- Reiser, R.F., Robbins R.N., Noleto A.L., Khoe G.P. und Bergdoll M.S. (1984):
Identification, purification and some physicochemical properties of staphylococcal enterotoxin C₃
Inf. Immun. 45, 625-630
- Richter, U. und Karsch W. (1980):
Herstellung diagnostischer Antiseren zum Nachweis der Staphylokokken-Enterotoxine A - E
Z. ges. Hyg. 26, 53-55
- Roitt, I.M., Brostoff J. und Male D.K. (1987):
Kurzes Lehrbuch der Immunologie
Deutsche Übersetzung von I. Harabacz
Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York
- Romagnani, S., Biagiotti R., Giudici M.G., Almerigogna F., Alessi A. und Ricci M. (1984):
Protein A and enterotoxin A: Two distinct staphylococcus mitogens for human T lymphocytes
J. Immunol. 132, 566-588
- Rolle, M. und Mayr A. (1984):
Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre
5. Auflage
Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart
- Schantz, E.J., Roessler W.G., Woodburn M.G., Lynch J.M., Jakoby H.M., Silvermann S.J., Gorman J.C. und Spero L. (1972):
Purification and some chemical and physical properties of staphylococcal enterotoxin A
Biochemistry 11, 960-966

- Scheuber P.H., Mossmann H., Beck G. und Hammer D.K. (1983):
Direct skin test in highly sensitized guinea pigs for rapid
and sensitive determination of staphylococcal enterotoxin B
Appl. Environ. Microbiol. 46, 1351-1356
- Scheuber, P.H., Golecki J.R., Kickhöven B., Scheel D., Beck G und
Hammer D.K. (1985):
Skin reactivity of unsensitized monkeys upon challenge with
staphylococcal enterotoxin B: A new approach for
investigating the site of toxin action
Inf. Immunol. 50, 869-876
- Scheuber, P.H., Denzlinger C., Wilker D., Beck G., Keppler D. und
Hammer D.K. (1987):
Cysteinyl leukotrienes as mediators of staphylococcal
enterotoxin B in monkeys
Europ. J. Clin. Invest. 17
- Schmidt, J.J. und Spero L. (1983):
The complete amino acid sequence of staphylococcal
enterotoxin C₁
J. Biol. Chem. 258, 6300-6306
- Schreiner, H. (1985):
Zum Nachweis von Staphylokokken-Enterotoxinen am
Modell des Typ C₁ mit dem Sandwich-ELISA
Diss. med. vet. München
- Seppälä, I.J.T., Sarvas H., Peterfy H. und Mäkela O. (1981):
The four subclasses of IgG can be isolated from mouse
serum by using protein A-sepharose
Scand. J. Immunol. 14, 335-342
- Shands, J.W., Peavy D.L. und Smith (1973):
Differential morphology of mouse spleen cells stimulated in
vitro by endotoxin, phytohemagglutinin, pokeweed mitogen
and staphylococcal enterotoxin B
A. J. Pathol. 70, 1-24

- Silverman, S.J., Moore G.T. und. Rössler W.G. (1969):
Effect of formaldehyde on the immunogenicity of staphylococcal enterotoxin B for *Macaca mulatta*
J. Bact. 98, 443-446
- Smith, B.G. und Archer D.L. (1978):
Inhibition of the in vitro antibody response by staphylococcal enterotoxin E
Abstr. Ann. Meet. Am. Soc. Mikrobiol. (E 171), p.71
- Smith, B.G. und Johnson H.M. (1975):
The effect of staphylococcal enterotoxins on the primary in vitro immune response
J. Immunol. 115, 575-578
- Sommerfeld, P. und Terplan G. (1975):
Methoden zum Nachweis von Staphylokokken-Enterotoxine
Arch. Lebensmittelhyg. 26, 128-137
- Spero, L. und Morlock B.A. (1979):
Cross-reactions between tryptic polypeptides of staphylococcal enterotoxins B and C₁
J. Immunol. 122, 1285-1289
- Spero, L., Morlock B.A. und Metzger J.F. (1978):
On the cross-reactivity of staphylococcal enterotoxins A, B and C₁
J. Immunol. 120, 86-89
- Steinhardt, I. (1983):
Einfluß von Staphylokokken-Enterotoxinen auf immunologische Vorgänge - Eine Literaturstudie -
Diss. med. vet. München
- Surgalla, M.S., Bergdoll M.S. und Dack G.M. (1954):
Staphylococcal enterotoxin: neutralization by rabbit antiserum
J. Immunol. 72, 398-403

- Thompson, N.E., Ketterhagen M.J. und Bergdoll M.S. (1984);
Monoclonal antibodies to staphylococcal enterotoxins B and C₁:
Cross-Reactivity and localisation of epitopes on tryptic
fragments
Infect. Immun. 45, 281-285
- Thompson, N.E., Bergdoll M.S., Meyer R.F., Bennet R.W., Miller L. und
Macmillan J.D.(1985):
Monoclonal antibodies to the enterotoxins and the toxic shock
syndrom toxin produced by staphylococcus aureus
in: Macario A.J.L. und Macario E.C.:
Monoclonal antibodies against bacteria, Vol. 2, 23-59
Academic Press, Inc. , Orlando, London
- Thompson, N.E., Razdan M., Kunstmann G., Aschenbach J.M., Evenson
M.L. und Bergdoll M.S. (1986):
Detection of staphylococcal enterotoxins by enzyme-linked
immunosorbent assays and radioimmunoassays: Comparison of
monoclonal and polyclonal antibody systems
Appl. Environ. Microbiol. 51, 885-890
- Tizard, I.R. (1981):
Einführung in die veterinärmedizinische Immunologie
Bearbeitung und Übersetzung von H.G. Buschmann
Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg
- Torres, B.A., Farrar W.L. und Johnson H.M. (1982):
Interleukin 2 regulates immune interferon (IFN γ) production
by normal and suppressor cell cultures
J. Immunol. 128, 2217-2219
- Uhlrich, J.T. und Johnson H.M. (1978):
Comparative mitogenesis of staphylococcal enterotoxin A,
conavalin A and phytohemagglutinin in the murine system
- Van Miert, A.S., Van Duin C.T. und Schotman A.J. (1984):
Comparative observations of fever and associated clinical
hematological and blood biochemical changes after intravenous
administration of staphylococcal enterotoxins B and F (toxic
shock syndrom toxin-1) in goats
Inf. Immunol. 46, 354-360

Voller, A., Bartlett A. und Bidwell D.E. (1978):

Enzyme immunoassays with special reference to ELISA techniques.
J. Clin. Pathol. 31, 507-520

Vorländer, K.O., (1983):

Immunologie

2. Auflage

Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York

Warren, J.R., Spero L., Metzger J.F. und MC Gann V.G. (1975):

Immunogenicity of formaldehyde-inactivated enterotoxins A and C₁
of staphylococcus aureus
J. Infect. Dis. 131, 535-542

Warren, J.R., D.L. Leatherman und J.F. Metzger (1975):

Antigenicity of formaldehyde-inactivated staphylococcal
enterotoxin B
J. Immunol. 111, 885-892

7. Abkürzungen

SE	Staphylokokken-Enterotoxin(e)
SEA	Staphylokokken-Enterotoxin A
SEB	Staphylokokken-Enterotoxin B
SEC	Staphylokokken-Enterotoxin C
SEC ₁ , SEC ₂	Staphylokokken-Enterotoxin C ₁ , C ₂
SEC ₃	Staphylokokken-Enterotoxin C ₃
SED	Staphylokokken-Enterotoxin D
SEE	Staphylokokken-Enterotoxin E
MW	Molekulargewicht
MP	Makrophagen
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
mAk	monoklonaler Antikörper
FMS	Fusionsmausserum
sf-	serumfrei
PO	Peroxidase
O.D.	optische Dichte
ELISA	Enzyme linked immunoabsorbent assay

DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. mult. A. Mayr danke ich herzlich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes am Institut für Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenmedizin.

Herrn Prof. Dr. H. G. Buschmann danke ich sehr für die Überlassung des Themas und seine jederzeit großzügig gewährte Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. G. Terplan danke ich für die Bereitstellung der Toxine und die stete Hilfsbereitschaft.

Besonders danke ich Herrn Dr. C.-P. Czerny für seine wertvolle Kritik.

Allen Mitarbeitern des Instituts, insbesondere aus unserer Abteilung, die zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen haben, möchte ich an dieser Stelle ebenfalls meinen Dank aussprechen.

Ohne Wolfgang hätte ich diese Arbeit viel früher oder nie beendet!

LEBENS LAUF

1961 geboren am 11. April in Oberstaufen,
Eltern: Franz-Xaver Kienle und Martha Maria
Kienle, geb. Löchle

1967 Volksschule Thalkirchdorf

1971 Gymnasium Sonthofen

1979 Gertrud von le Fort Gymnasium Oberstdorf

1980 Abitur

1980 Studium der Tiermedizin in München

1982 Studium der Tiermedizin an der Kansas State
University in Manhattan, Kansas, USA, als
Austauschstudent der LMU München
Exmatrikulation mit Studienplatzgarantie

1983 Wiederaufnahme des Studiums der Tiermedizin
in München

1986 Staatsexamen

1987 Approbation als Tierärztin

Beginn der vorliegenden Dissertation

